



*Universidad Autónoma de Madrid*  
*Facultad de Ciencias*  
*Departamento de Biología*

TESIS DOCTORAL

# INTERRELACIONES DEL COMPLEJO DE COHESINA, LA RECOMBINACIÓN Y LA SINAPSIS EN LA MEIOSIS DE ORTÓPTEROS



ADELA CALVENTE ARROYO  
MADRID 2009







*Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias*

# **INTERRELACIONES DEL COMPLEJO DE COHESINA, LA RECOMBINACIÓN Y LA SINAPSIS EN LA MEIOSIS DE ORTÓPTEROS**

*(Interrelationships among the cohesin complex,  
recombination and synapsis in Orthopteran meiosis)*

Memoria presentada por Dña. Adela Calvente Arroyo para optar al grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas con Mención Europea.

Madrid, 2009

VºBº Director de la Tesis Doctoral

VºBº Director de la Tesis Doctoral

Dr. Julio Sánchez Rufas  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Jesús Page Utrilla  
Departamento de Biología  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid



El presente trabajo ha sido desarrollado principalmente en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid. En el desarrollo de la Tesis Doctoral, Dña. Adela Calvente Arroyo ha realizado dos estancias de investigación, una en el “*Queen’s Medical Research Institute*” de la Universidad de Edimburgo (Reino Unido), cuyo trabajo fue tutelado por la Dra. Margarete MS Heck y otra en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Birmingham (Reino Unido), cuyo trabajo fue tutelado por el Dr. Eugenio Sánchez Morán. De los resultados obtenidos de la investigación presentada en esta Tesis Doctoral se han publicado tres artículos en revistas científicas: Viera, A., Santos, J.L. y col., 2004. ***EMBO reports***. 4: 385-391; Viera, A., Calvente A. y col., 2004. ***Cytogenet Genome Res.*** 106: n°2-4: 302-308; Calvente, A., Viera, A. y col., 2005. ***Journal of Cell Science*** 118: 2957-2963.

La investigación ha sido financiada por la Consejería de Educación de la Comunidad Madrid mediante la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) a Dña. Adela Calvente Arroyo. Cumpliéndose dos años de becaria FPI y dos años de contrato en prácticas como Personal Docente e Investigador en Formación (PDIF) en la Universidad Autónoma de Madrid. Además la investigación ha sido subvencionada por los proyectos BMC2002-00043 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, un proyecto del Centro de Estudios de América Latina-Banco Santander Central Hispano, BFU2005-01266 y BFU2006-06655 del Ministerio de Educación y Ciencia, el proyecto A/017762/08 del Ministerio de Asuntos Exteriores y Cooperación y por Olympus España.



*A mis padres, por su apoyo incondicional.  
A mi hermano por su complicidad.  
A Alberto por su infinita paciencia.*

*“Es mejor saber después de haber pensado y discutido que  
aceptar los saberes que nadie discute para no tener que pensar”*  
Fernando Savater









La parte de los agradecimientos es de las más bonitas de una Tesis, pero a su vez la más complicada. A lo largo de estos años, desde que se empieza la carrera y en el tiempo de realización del doctorado, conoces y trabajas con muchas personas que, cada una a su manera, contribuyen a que llegues hasta aquí. Cuando comienzas a escribir tienes miedo de olvidarte de alguien o de no darle la suficiente importancia. Hay muchas personas a las que agradecer y dedicar este trabajo y todas tienen su hueco en mi corazón.

Quisiera empezar agradeciendo a mi director, el Dr. Julio Sánchez Rufas, la oportunidad de investigar y su confianza en mí durante todos estos años. Por supuesto al Dr. Carlos García de la Vega por decirme donde preguntar. De igual forma no puedo pasar por alto la importante labor de mi codirector, el Dr. Jesús Page Utrilla, por su mirada crítica y constructiva y por su apoyo durante todo este tiempo. Este trabajo no habría sido posible sin la colaboración directa del Dr. Alberto Viera Vicario. Gracias Alberto por esos años de compañero de despacho. Un placer. Quizá una de las personas más influyentes durante estos años haya sido el Dr. Juan Luis Santos, sin él no habría descubierto a las "*Stethophymas*" ni habría llegado donde estoy. Muchas gracias por todo tu apoyo, esfuerzo, comprensión y trabajo. También gracias por tus "bronquitas"...

Un laboratorio aparentemente tranquilo se convierte en el camarote de los hermanos *Marx* cuando andamos todos trabajando, eso es parte de la diversión. Lo que no se todavía es cómo nos ponemos de acuerdo para coincidir el mismo día. Gracias Mayte por todos tus consejos, sin ti el barco se hundiría muchas veces. Mónica, Jose, gracias por vuestro tiempo. Roberto, gracias por tus opiniones. Gracias Rocío, sin tu apoyo no habría superado muchos de los baches del largo camino. Gracias por esas miradas cómplices y esos desayunos. Gracias Marta Cifuentes, todavía recuerdo aquellas salidas a por hierba en nuestros comienzos. Que pena que te fueras, pero que alegría que te vaya tan bien.

Gracias a todos aquellos que amablemente me han cedido los anticuerpos, especialmente al Dr. José Luis Barbero y la Dra. Margarette MS Heck, sin ellos este trabajo hubiera sido imposible. Gracias a Ana Cuadrado por ayudarme con los blotts. Gracias también a las chicas del irradiador, por vuestra disposición siempre tan amable. De igual forma quisiera agradecer al Dr. Chris Franklin y al Dr. Ricardo Benavente la realización de sendos informes que me permiten optar a la Mención Europea. Por supuesto quisiera agradecer muy especialmente la colaboración de la Dra. Margarette MS Heck del Queen's Medical Research Institute de la Universidad de Edimburgo y del Dr. Eugenio Sánchez Morán (Uge) de la Universidad de Birmingham, en el Reino Unido. Gracias por permitirme realizar sendas estancias de investigación, dándome así la oportunidad de conocer y participar en vuestros proyectos y por acogerme en vuestros laboratorios como si fuera una más desde el primer día. Igualmente productivo fue mi paso esporádico por la Universidad Complutense. Gracias Mónica por toda tu ayuda con los primers, las bacterias, las PCRs... gracias por intentarlo conmigo. Algún día saldrá.

Gracias, "biólogada" por esos años de estudio, por esas horas en la biblioteca, esos viajes y "*rural party*", por esas risas y por las cenas de Navidad, por vuestra compañía y apoyo. Gracias Esther por esas llamadas "labo a labo". Gracias Virginia y Elena por tantas conversaciones. Gracias Marta, Myriam, Isabela, Ana, Nuria, Juanfran, Alex, Javi, Alberto, Miguel y demás..., por vuestros ánimos. Gracias a todos por los *tropecientos* e-mails que recibo si estoy una semana desconectada. Estar un par de horas delante del ordenador con

vuestras ralladuras, no siempre es de lo más divertido, todo quede dicho, pero me habéis hecho reír tantas veces... gracias por contar conmigo.

La realización de la Tesis Doctoral no se acaba cuando apagas el ordenador del despacho. Una Tesis te la llevas a casa, de vacaciones y los fines de semana. La familia lo sabe y a pesar de que su apoyo y comprensión es absoluto, no siempre es fácil.

Almudena, sobran las palabras. Se acaba un tema de conversación de nuestras cenas, pero eso a nosotras no nos falta. Cristina y Estefanía, gracias por vuestros ánimos y por estar siempre ahí, en el portal de al lado. Gracias Eduvigis por todo tu sincero interés.

Me gustaría dedicarles especialmente este trabajo a mis padres y a mi hermano. Gracias por vuestra dedicación, por vuestra paciencia. Gracias por vuestra confianza infinita. Este es el resultado de todas "esas cosas" que hago en el laboratorio con "los bichos". Sin vosotros no sería nada de lo que soy, ni nada de lo que seré. Gracias Alex por enseñarme a mirar la vida desde otro punto de vista. Gracias Papá por todas las visiones positivas que me aportas y por estar siempre disponible. Gracias Mamá, gracias por darte cuenta de todo, animarme, apoyarme y comprenderme siempre. Gracias por dejarme ser quien soy. Gracias por vuestras reflexiones y por vuestro impulso.

Si hay alguien a quien realmente quiero agradecer y dedicar esta tesis es a Alberto. Gracias por todo tu apoyo, interés y comprensión, por aguantar las penas y compartir las alegrías. Por creer en mí. Por estar siempre esperándome a que termine de trabajar y por animarme a superarme cada día.

*Por fin punto y final a una etapa.*

Y después de todo este largo camino, sólo puedo decir:

*"Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro"*  
René Descartes





<b>ADN:</b> <u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico	<b>SAC:</b> Punto de control de anclaje al huso (“ <u>S</u> pin <u>d</u> le <u>A</u> sembly <u>C</u> heckpoint”)
<b>APC:</b> Complejo promotor de anafase (“ <u>A</u> naphase <u>P</u> romotor <u>C</u> omplex”)	<b>SARs:</b> Regiones de anclaje al “scaffold” (“ <u>S</u> caffold- <u>A</u> ttachment <u>R</u> egions”)
<b>ARN:</b> <u>Á</u> cido <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleico	<b>SBC:</b> <u>S</u> ob <u>r</u> ecruzamiento
<b>ATM:</b> Ataxia-telangiectasia mutado (“ <u>A</u> taxia- <u>T</u> elangiectasia <u>M</u> utated”)	<b>SCC:</b> Cohesión de cromátidas hermanas (“ <u>S</u> ister <u>C</u> hromatid <u>C</u> ohesion”)
<b>ATR:</b> ATM y RAD3 relacionados (“ <u>A</u> TM and <u>R</u> ad3-related”)	<b>SMC:</b> Mantenimiento estructural del cromosoma (“ <u>S</u> tructural <u>M</u> aintenance of <u>C</u> hromosome”)
<b>CG:</b> <u>C</u> onversión <u>G</u> énica	<b>SSC:</b> <u>S</u> olución <u>S</u> alina <u>C</u> itrada
<b>CS:</b> <u>C</u> omplejo <u>S</u> inaptonémico	<b>SYCE1:</b> Elemento Central del Complejo Sinaptonémico 1 (“ <u>S</u> ynaptonemal <u>C</u> omplex <u>C</u> entral <u>E</u> lement <u>1</u> ”)
<b>DSB:</b> Roturas de doble cadena o de doble hebra (“ <u>D</u> ouble- <u>S</u> trand <u>B</u> reaks”)	<b>SYCE2:</b> Elemento Central del Complejo Sinaptonémico 2 (“ <u>S</u> ynaptonemal <u>C</u> omplex <u>C</u> entral <u>E</u> lement <u>2</u> ”)
<b>EA:</b> <u>E</u> lemento <u>A</u> xial	<b>SYCP1:</b> Proteína del Complejo Sinaptonémico 1 (“ <u>S</u> ynaptonemal <u>C</u> omplex <u>P</u> rotein <u>1</u> ”)
<b>EC:</b> <u>E</u> lemento <u>C</u> entral	<b>SYCP2:</b> Proteína del Complejo Sinaptonémico 2 (“ <u>S</u> ynaptonemal <u>C</u> omplex <u>P</u> rotein <u>2</u> ”)
<b>EL:</b> <u>E</u> lemento <u>L</u> ateral	<b>SYCP3:</b> Proteína del Complejo Sinaptonémico 3 (“ <u>S</u> ynaptonemal <u>C</u> omplex <u>P</u> rotein <u>3</u> ”)
<b>FT:</b> <u>F</u> ilamentos <u>T</u> ransversos	<b>TEX12:</b> Secuencia 12 Expresada en Testículo (“ <u>T</u> estis <u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>12</u> ”)
<b>g:</b> Gramo	<b>UENH:</b> <u>U</u> nión de <u>E</u> xtremos <u>N</u> o <u>H</u> omólogos (“ <u>N</u> on-homologous end joining”)
<b>Gy:</b> Gray (unidad de radiación)	<b>V:</b> Voltios
<b>HKMT:</b> Metiltransferasa de histonas en lisinas (“ <u>H</u> istone <u>L</u> ysine <u>M</u> ethyl <u>t</u> ransferases”)	<b>μl:</b> Microlitro
<b>HP1:</b> Proteína de la Heterocromatina 1 (“ <u>H</u> eterochromatin <u>P</u> rotein <u>1</u> ”)	<b>μm:</b> Micras
<b>INCENP:</b> Proteína centromérica interna (“ <u>I</u> nn <u>e</u> r <u>C</u> entromeric <u>P</u> rotein”)	
<b>KDa:</b> Kilo Dalton	
<b>M:</b> Molar	
<b>mA:</b> Miliamperios	
<b>mg:</b> Miligramo	
<b>ml:</b> Mililitro	
<b>mM:</b> Milimolar	
<b>MRN:</b> Complejo <u>M</u> re11- <u>R</u> ad51- <u>N</u> bs1	
<b>N:</b> Normal	
<b>NR:</b> <u>N</u> ódulos de <u>R</u> ecombinación	
<b>NSBC:</b> <u>N</u> o <u>S</u> ob <u>r</u> ecruzamiento	
<b>PAR:</b> Región Pseudoautosómica (“ <u>P</u> seudoautosomic <u>R</u> egion”)	
<b>PBS:</b> Tampón fosfato salino (“ <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline”)	
<b>PIKK:</b> Kinasas tipo fosfatidil inositol 3 (“ <u>P</u> hosphatidyl <u>I</u> nositol 3- <u>K</u> inase-like <u>K</u> inases”)	
<b>RH:</b> <u>R</u> ecombinación <u>H</u> omóloga	
<b>SA1:</b> “ <u>S</u> tromal <u>A</u> ntigen <u>1</u> ”	









**INTRODUCCIÓN**

Figura 1 .....	pág. 16 y 17
Figura 2 .....	pág. 20
Figura 3 .....	pág. 28
Figura 4 .....	pág. 37
Figura 5 .....	pág. 40
Figura 6 .....	pág. 47

**MATERIAL Y MÉTODOS**

Figura 7 .....	pág. 57
----------------	---------

**RESULTADOS**

Figura 8 .....	pág. 77
Figura 9 .....	pág. 78
Figura 10 .....	pág. 80
Figura 11 .....	pág. 83
Figura 12 .....	pág. 84
Figura 13 .....	pág. 85
Figura 14 .....	pág. 86
Figura 15 .....	pág. 87
Figura 16 .....	pág. 89
Figura 17 .....	pág. 91
Figura 18 .....	pág. 92
Figura 19 .....	pág. 94
Figura 20 .....	pág. 95
Figura 21 .....	pág. 96
Figura 22 .....	pág. 97
Figura 23 .....	pág. 98
Figura 24 .....	pág. 99
Figura 25 .....	pág. 100
Figura 26 .....	pág. 101
Figura 27 .....	pág. 102
Figura 28 .....	pág. 103
Figura 29 .....	pág. 105
Figura 30 .....	pág. 106
Figura 31 .....	pág. 108
Figura 32 .....	pág. 109
Figura 33 .....	pág. 110
Figura 34 .....	pág. 111
Figura 35 .....	pág. 112
Figura 36 .....	pág. 113
Figura 37 .....	pág. 114

Figura 38 .....	pág. 115
Figura 39 .....	pág. 116
Figura 40 .....	pág. 117
Figura 41 .....	pág. 119
Figura 42 .....	pág. 121
Figura 43 .....	pág. 121
Figura 44 .....	pág. 123
Figura 45 .....	pág. 124
Figura 46 .....	pág. 125
Figura 47 .....	pág. 126
Figura 48 .....	pág. 128
Figura 49 .....	pág. 130
Figura 50 .....	pág. 131
Figura 51 .....	pág. 132
Figura 52 .....	pág. 134
Figura 53 .....	pág. 135
Figura 54 .....	pág. 137
Figura 55 .....	pág. 138
Figura 56 .....	pág. 140
Figura 57 .....	pág. 141
Figura 58 .....	pág. 143
Figura 59 .....	pág. 144
Figura 60 .....	pág. 145
Figura 61 .....	pág. 146
Figura 62 .....	pág. 147
Figura 63 .....	pág. 148
Figura 64 .....	pág. 149

**DISCUSIÓN**

Figura 65 .....	pág. 156
Figura 66 .....	pág. 159
Figura 67 .....	pág. 160
Figura 68 .....	pág. 169
Figura 69 .....	pág. 172
Figura 70 .....	pág. 173
Figura 71 .....	pág. 174
Figura 72 .....	pág. 175
Figura 73 .....	pág. 177
Figura 74 .....	pág. 181
Figura 75 .....	pág. 187
Figura 76 .....	pág. 201
Figura 77 .....	pág. 204







<b>RESUMEN / ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
1. Etapas de la meiosis .....	18
1.1. Primera división meiótica.....	18
1.2. Segunda división meiótica .....	22
2. La cohesión.....	23
2.1. Componentes del complejo de cohesina .....	23
2.2. Dinámica del complejo de cohesina .....	25
2.3. Cofactores del complejo de cohesina: complejo de cohesión .....	27
2.4. Organización estructural del complejo de cohesina y su interacción con el ADN .....	28
2.5. Liberación de la cohesión: Mitosis <i>vs</i> Meiosis .....	30
3. La recombinación .....	31
3.1. Producción de “DSB” meióticas .....	32
3.2. Señalización de “DSB” e incorporación de recombinasas .....	33
3.3. Formación de intermediarios de Holliday y su resolución .....	35
3.4. Interferencia y localización de quiasmas.....	38
4. Relación entre la recombinación y la sinapsis.....	38
5. La composición y conformación de la cromatina .....	40
6. Estructura del cromosoma meiótico .....	43
7. Los saltamontes como modelo de estudio.....	44
.....	.....
<b>OBJETIVOS / OBJECTIVES .....</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
Material.....	57
Métodos .....	58
1. Fijación del material.....	58
1.1. Etanol-acético .....	58
1.2. Formaldehído-tritón.....	58
1.3. Paraformaldehído .....	58
2. Obtención de meiocitos .....	58
2.1. Aplastados .....	58
2.2. Esparcidos de espermatozoides fijados en paraformaldehído.....	59
3. Anticuerpos.....	61
3.1. Anticuerpos primarios.....	61
3.2. Anticuerpos secundarios .....	65
4. Extractos de proteínas .....	66
4.1. Extracto de proteínas de testículos de saltamontes .....	66
4.2. Extracto de proteínas de testículo de ratón.....	66
4.3. Extracto de proteínas de cultivos celulares.....	66
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida y “Western Blott” .....	67
6. Inmunoprecipitación .....	69
7. Tratamiento de irradiación con rayos gamma .....	70
8. Tinciones.....	71

8.1. Tinción argéntica sobre aplastados .....	71
8.2. Tinción con orceína acética .....	71
9. Inmunofluorescencia.....	72
9.1. Preparación del material.....	72
9.2. Protocolo .....	72
10. Observaciones de las muestras: captura y procesamiento de imágenes .....	74

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
1. "Western Blott" .....	77

### *Análisis de la meiosis en especies sin restricción en la recombinación ni en la sinapsis*

2. Análisis de las cohesinas en espermatoцитos de <i>E. plorans</i> y <i>L. migratoria</i> .....	79
2.1. Análisis de las cohesinas SMC .....	79
2.1.1. Las cohesinas SMC como marcadores de sinapsis .....	79
2.1.2. Las cohesinas SMC persisten en diplotena .....	82
2.1.3. Distribución de las cohesinas SMC en cromosomas condensados.....	85
2.2. Análisis de la cohesina SA1 .....	88
2.2.1. SA1 se detecta en regiones de sinapsis.....	88
2.2.2. SA1 se acumula en los centrómeros en metafase I .....	90
2.2.3. SA1 permanece en la región centromérica la segunda división meiótica. ...	93
2.3. Análisis de la cohesina RAD21 .....	94
2.3.1. La detección de RAD21 coincide con la sinapsis .....	94
2.3.2. Distribución de RAD21 en metafase I .....	96
2.4. Detección secuencial y no colocalización de SMC3 y RAD21 .....	98
3. Secuencia de la recombinación y la sinapsis.....	103
3.1. El marcaje de $\gamma$ -H2AX precede a la sinapsis .....	104
3.2. El cromosoma X presenta marcaje de $\gamma$ -H2AX hasta paquitena .....	105
3.3. RAD51 se localiza sobre el eje de cohesinas con posterioridad a $\gamma$ -H2AX .....	107
4. Univalentes naturales en <i>E. plorans</i> .....	110
4.1. Cromatina y distribución de la cohesina SMC3 .....	110
4.2. Distribución de SA1.....	112
4.3. La estructura del X y del B coinciden en metafase I .....	114
4.4. $\gamma$ -H2AX y RAD51 en el X y en el B .....	115

### *Análisis de la meiosis en una especie con sinapsis incompleta y localización de quiasmas*

5. El complemento cromosómico de los machos de <i>S. grossum</i> .....	118
6. Análisis de las cohesinas en <i>S. grossum</i> .....	119
6.1. Maduración polarizada de los ejes de cohesina en profase I.....	119
6.2. Cohesina SMC3 y estructura cromosómica en metafase I .....	123
6.3. Detección de RAD21 en regiones de sinapsis .....	126
7. Polarización de $\gamma$ -H2AX, RAD51 y H3K9me3.....	127
7.1. Detección polarizada de $\gamma$ -H2AX y RAD51 previa a la sinapsis. ....	127
7.2. El marcaje de $\gamma$ -H2AX y RAD51 coinciden en la misma región. ....	129

7.3. Localización proximal y polarización de H3K9me3.....	132
<b>Efectos de la irradiación gamma en la meiosis de machos de <i>Stethophyma grossum</i></b>	
8. Inducción de “DSB” en toda la cromatina.....	136
9. Efectos de la irradiación gamma en profase I .....	139
9.1. Estudio de la incorporación de RAD51. ....	139
9.2. La localización de RAD51 coincide con la polarización de H3K9me3.....	141
9.3. Ausencia de sinapsis completa tras la irradiación. ....	142
10. Efectos de la irradiación gamma en el número y localización de quiasmas.....	143
10.1. Efectos entre 1 y 3 días después la irradiación .....	143
10.2. Efectos a los 4 y 5 días después de la irradiación.....	144
10.3. Efectos entre los días 6 y 12 tras la irradiación.....	148
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
1. Dinámica y distribución de las cohesinas en saltamontes.....	153
1.1. Seguimiento del proceso sináptico mediante SMC3 y SMC1 $\alpha$ .....	153
1.2. Sinapsis parcial en <i>S. grossum</i> : inferencias desde el eje de cohesina .....	154
1.3. Detección secuencial de las cohesinas en profase I.....	155
1.4. Distribución de las cohesinas desde metafase I hasta telofase II .....	157
1.5. Historia sináptica de los cromosomas .....	162
1.6. Posibles funciones adicionales de SA1. ....	163
2. Dinámica de los complejos de cohesina.....	164
3. Las cohesinas y la estructura del cromosoma meiótico.....	167
3.1. El eje de cohesina se arma a nivel del “scaffold”, en la base de los bucles .....	168
3.2. Las cohesinas y la estructura de los cromosomas en metafase I.....	170
3.2.1. Bivalentes con sinapsis completa.....	170
3.2.2. Cromosomas asinápticos: X y B .....	173
3.2.3. Bivalentes con sinapsis incompleta .....	175
3.3. Recolocación de las cohesinas en diplotena: modelo de trabajo .....	178
4. Univalentes naturales en <i>E. plorans</i> .....	182
5. Relación temporal entre la recombinación y la sinapsis.....	184
5.1. El inicio de la recombinación es anterior a la sinapsis. ....	185
5.2. La señal de $\gamma$ -H2AX en los autosomas en paquitena .....	186
5.3. La señal de $\gamma$ -H2AX en las espermátidas.....	188
6. La recombinación recíproca en <i>S. grossum</i> .....	188
6.1. Relación entre la maduración del eje de cohesina y las “DSB” .....	189
6.2. La importancia de la cromatina .....	190
6.3. RAD51, el alineamiento cromosómico y la sinapsis .....	192
6.4. Restricción y localización de quiasmas: interferencia .....	193
6.5. La sucesión de acontecimientos en <i>S. grossum</i> .....	194
7. Inducción de “DSB” en los machos de <i>S. grossum</i> .....	194
7.1. ¿Vías de reparación distintas en regiones donde se han inducido “DSB”? .....	195
7.2. Posibles factores implicados en la distribución heterogénea de RAD51 .....	198
7.3. No se observa una situación de sinapsis completa.....	199

7.4. La organización nuclear de los cromosomas no facilita la interacción entre las regiones distales de los cromosomas largos.....	200
7.5. La presencia de tetravalentes y bivalentes con dos quiasmas indican el ritmo de la recombinación y la meiosis.....	202
7.6. La regulación de la recombinación en los machos de <i>S. grossum</i> va más allá de la producción de “DSB”.....	205
<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS .....</b>	<b>207</b>
<b>ANEXO 1: Relación del material suplementario .....</b>	<b>213</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>219</b>







La meiosis es un tipo especializado de división celular mediante el cual los organismos con reproducción sexual mantienen su número cromosómico generación tras generación. En este proceso se generan gametos haploides después de dos rondas sucesivas de segregación cromosómica, entre las cuales no se produce replicación de ADN. Durante la primera profase meiótica, los cromosomas homólogos forman bivalentes estables como consecuencia de un reconocimiento previo entre cada par de homólogos y su posterior alineamiento (apareamiento), sinapsis (asociación íntima de los cromosomas apareados mediante las proteínas que forman parte del complejo sinaptonémico) y recombinación (intercambio de regiones cromosómicas). Las conexiones físicas entre los cromosomas homólogos, producidas como consecuencia de sucesos de recombinación recíproca (quiasmas), así como la cohesión entre cromátidas hermanas, mediada principalmente por el complejo de cohesina, son procesos esenciales para la estabilización de los bivalentes en metafase I y la correcta segregación de cromosomas homólogos durante la anafase I. En la segunda división meiótica se separan cromátidas hermanas tras la liberación de la cohesión entre cinetocoros hermanos. La fusión de los gametos de distinto sexo restaura finalmente el número cromosómico diploide de la especie e inicia el desarrollo cigótico.

La cohesión de cromátidas hermanas durante la meiosis es esencial para mantener unidos los cinetocoros hermanos en metafase I, permitiendo que, tras la liberación de las cohesinas en los brazos cromosómicos, segreguen cromosomas homólogos en la anafase I. Además la cohesión en meiosis se requiere para la formación de estructuras cromosómicas como el complejo sinaptonémico e incluso para el desarrollo de la recombinación meiótica y el intercambio de material genético entre cromosomas homólogos. En este contexto se plantea la presente Tesis Doctoral, cuyo principal objetivo es el estudio de las interrelaciones existentes entre la recombinación meiótica, la sinapsis y la cohesión de cromátidas hermanas. Nos hemos interesado especialmente por la dinámica y localización de diferentes subunidades del complejo de cohesina a lo largo de la meiosis. Además, hemos analizado la relación de la secuencia temporal existente entre el inicio de la recombinación y la sinapsis, estudiando el papel de las cohesinas en ambos procesos. Todos estos fenómenos se suceden y coordinan en los cromosomas durante las diferentes etapas de la meiosis. Puesto que la estructura y

organización de los cromosomas cambia a lo largo de las divisiones meióticas, e influye en todos estos procesos, otro de nuestros objetivos ha sido el análisis de la estructura del cromosoma meiótico relacionada con la localización del complejo de cohesina y con la historia sináptica de cada cromosoma.

Para nuestro propósito hemos utilizado un modelo clásico en estudios citogenéticos, los saltamontes. Concretamente hemos analizado la meiosis masculina de tres especies: *Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* y *Stethophyma grossum*. Todas ellas muestran un complemento cromosómico que comprende 22 autosomas y un determinismo cromosómico del sexo XX en las hembras y X0 en los machos. Este último factor nos ha permitido estudiar el comportamiento de un univalente natural, el cromosoma X. Además, algunos individuos de la especie *Eyprepocnemis plorans* presentan cromosomas accesorios, también llamados cromosomas B, caracterizados por no formar parte del complemento A de la especie ni interactuar con ellos, aunque algunos de ellos podrían haber evolucionado a partir del cromosoma X. Seleccionando individuos con un único cromosoma B, hemos podido estudiar otro tipo de univalente natural durante la meiosis. Por su parte, los machos de la especie *Stethophyma grossum*, muestran sinapsis incompleta y localización proximal de los quiasmas en 8 de sus 11 bivalentes. En conjunto, entre las tres especies hemos estudiado el comportamiento de bivalentes con sinapsis completa, de bivalentes con sinapsis incompleta que presentan localización de quiasmas y de univalentes como el cromosoma X o los cromosomas accesorios.

Para abordar los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral e intentar aportar nuevos datos para esclarecer la localización del complejo de cohesina, su incorporación y liberación en meiosis, además de intentar conocer su papel en situaciones de restricción de sinapsis y recombinación, hemos estudiado la dinámica y localización de diferentes subunidades del complejo de cohesina: SMC3, SMC1 $\alpha$ , RAD21 y SA1. La inmunodetección de SMC3 y SMC1 $\alpha$  durante la profase I nos ha permitido analizar el progreso de la sinapsis. Además hemos analizado la localización de dos proteínas implicadas en el inicio de la recombinación:  $\gamma$ -H2AX y RAD51 y una modificación histónica, la trimetilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9me3), la cual se relaciona con heterocromatina en mamíferos. La detección de las proteínas ha sido realizada

mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos específicos sobre aplastados y esparcidos de espermatoцитos. El aplastado de espermatoцитos es una técnica que permite mantener el volumen celular y la estructura cromosómica, mostrándose como una herramienta muy útil a la hora de estudiar la localización de las proteínas y su relación espacial y estructural en el cromosoma meiótico y entre sí.

El análisis de las diferentes subunidades del complejo de cohesina en la profase I de saltamontes indica una incorporación secuencial de las mismas, encontrando que SMC3 y SMC1 $\alpha$  se visualizan en forma de ejes en profase I desde leptotena y es sólo al comienzo de cigotena cuando se incorporan RAD21 y SA1 a los cromosomas, coincidiendo en el espacio y en el tiempo con el progreso de la sinapsis. Posteriormente, en cromosomas condensados de metafase I, detectamos que ambos grupos de subunidades del complejo de cohesina, las SMC y las no SMC, RAD21 y SA1, están presentes en el dominio intercromatídico de regiones cromosómicas que han presentado sinapsis en paquitena, aunque no colocalizan completamente. Sin embargo, hemos observado que las subunidades no SMC estudiadas están ausentes en el dominio intercromatídico de univalentes y regiones cromosómicas que no han presentado sinapsis durante la profase I. Por lo tanto hemos relacionado la presencia de determinadas subunidades del complejo de cohesina en cromosomas en metafase I con su historia sináptica en la profase I previa, infiriendo que la presencia de determinadas subunidades del complejo de cohesina en el dominio intercromatídico de los cromosomas estaría estrechamente relacionada con el ensamblaje del complejo sinaptonémico. Por otro lado, hemos observado que la liberación de las distintas subunidades del complejo de cohesina estudiadas se produce también de forma gradual. En este sentido, mientras que el marcaje de RAD21 se pierde completamente en la transición metafase I – anafase I, SMC3 y SMC1 $\alpha$  persisten hasta telofase I en regiones centroméricas y detectamos únicamente SA1 hasta telofase II en los cinetocoros. De todos estos datos hemos inferido que en la meiosis de los machos de saltamontes debe existir más de un tipo de complejo de cohesina. En relación a la estructura cromosómica en meiosis, discutimos la posición de las cohesinas y hemos generado un posible modelo de trabajo donde proponemos una recolocalización de los complejos de cohesina desde una posición exclusivamente a nivel de base de los bucles de cromatina

en paquitena, hacia una posición que englobaría gran parte de la superficie de contacto entre las dos cromátidas hermanas en metafase I.

Por otro lado se ha realizado un estudio relativo a la relación temporal existente entre los procesos de inicio de la recombinación y el comienzo de la sinapsis entre los cromosomas homólogos. Actualmente se conocen dos modelos a este respecto, el primero está presente en ratón, humanos, *Arabidopsis thaliana* y levaduras, donde los fenómenos de inicio de la recombinación son previos y necesarios para la correcta formación del complejo sinaptonémico. En el segundo modelo, la sinapsis es previa al inicio de la recombinación y lo encontramos en *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*. Nuestras investigaciones en saltamontes, realizadas mediante el estudio de la subunidad de cohesina SMC3, estrechamente relacionada con los elementos axiales de los cromosomas, y las proteínas  $\gamma$ -H2AX y RAD51 implicadas en el inicio de la recombinación, nos han permitido inferir que la recombinación en saltamontes comienza antes que la sinapsis, lo que implica que este tipo de insectos seguirían un modelo similar al observado en ratón, humanos, levaduras y *Arabidopsis thaliana* entre otros.

Los datos previos relativos a la meiosis de los machos de *Stethophyma grossum* describen la presencia de sinapsis parcial y restricción en la localización de quiasmas en 8 de sus bivalentes. Hemos analizado la evolución de los ejes de cohesina durante la profase I y hemos observado una polarización en la maduración de dichos ejes, distinguiéndose dos regiones nucleares, una más avanzada que la otra. Nuestros datos además apuntan a que las regiones avanzadas en la maduración del eje de SMC3 son las únicas donde se produce sinapsis. En los estudios que hemos realizado de las proteínas de inicio de la recombinación en esta especie, mostramos que las roturas programadas de doble cadena de ADN están restringidas a las regiones avanzadas en la maduración del eje de cohesina en las primeras etapas de la profase I. Además, en esta especie hemos realizado un estudio de la localización de la modificación histónica H3K9me3. Nuestras observaciones al respecto muestran que las roturas de doble cadena en el ADN se producen de forma restringida sobre regiones de cromatina donde está presente dicha modificación. Por lo tanto, este modelo de trabajo nos permite relacionar una maduración diferencial de eje de cohesina en los cromosomas con una restricción de los

lugares donde se producen las roturas de doble cadena y la posterior sinapsis de cromosomas homólogos. Además, estos fenómenos se polarizan en el núcleo y se relacionan con H3K9me3. Para profundizar en las relaciones existentes entre todos estos fenómenos, hemos realizado un tratamiento con rayos gamma con el fin de generar de forma generalizada roturas de doble cadena exógenas en el ADN. Nuestros resultados muestran que el sistema, a pesar de sufrir roturas de doble cadena generalizadas en toda la cromatina, no es capaz de cambiar su patrón de restricción sináptica, ni de localización de quiasmas entre cromosomas homólogos. Además hemos detectado que RAD51, una recombinasa implicada en reparación de daño genético, se incorpora preferiblemente sobre las regiones donde está presente la variante H3K9me3, aunque el daño en el ADN haya sido generalizado.

En resumen, en esta Tesis Doctoral aportamos evidencias citológicas de la posible existencia de diferentes complejos de cohesina en la meiosis de saltamontes y relacionamos la presencia y ausencia de distintas subunidades de cohesina con la historia sináptica de cada cromosoma. En cuanto a la relación temporal entre el inicio de la recombinación y la sinapsis, relacionamos a los saltamontes con modelos como el de ratón, humanos, levaduras y *A. thaliana*, diferenciándose de *D. melanogaster*. Además consideramos de vital importancia la maduración del eje de cohesina para el correcto progreso de fenómenos como la recombinación meiótica y la sinapsis y conferimos un papel especial a la organización nuclear y a la composición de la cromatina en la incorporación de proteínas de reparación.





Meiosis is a specialised type of cell division by which sexually reproducing eukaryotes maintain their chromosome number across generations. In this process, haploid gametes are produced by two successive rounds of chromosome segregation after a single DNA replication round. During first meiotic prophase, homologues form stable bivalents, a process which, in most organisms, involves homologous recognition with a subsequent step of intimate alignment (pairing), synapsis (close association of paired chromosomes by synaptonemal complex proteins) and recombination (exchange of chromosomal regions). The physical connections between homologues are produced as a consequence of reciprocal recombination events (chiasmata) and in combination with sister chromatid arm cohesion, are responsible for the correct biorientation of bivalents at metaphase I and the subsequent segregation of homologous chromosomes at anaphase I. Sister chromatids separate at the second division generating haploid gametes. Fusion of gametes at fertilisation restores the diploid chromosome number of the species and initiates zygote development.

Sister chromatid cohesion, which is largely the result of the activity of the cohesin complex, is not only necessary for homologous co-orientation at first meiotic division, but it also establishes a chromosome foundation required for the formation of higher order chromosome structures, including synaptonemal complex (SC). In this context, this Thesis is focused to the study of the interrelationships among the meiotic recombination, the synapsis and the cohesion. We have described here the dynamic and localization of different subunits of the cohesin complex during meiotic divisions. We have also analyzed the temporal relationship between recombination and synapsis, studying the role of the cohesin complex in both processes. It must be taken into account that the proper coordination of all of them in the chromosome is essential for a correct meiosis progression. On the other hand, the structure and organization of chromosomes change during the different stages of meiosis and may have an influence on recombination, synapsis and cohesion. To address this question, we have analyzed the meiotic chromosome structure in connection with the location of the cohesin complex and with the synaptic history of each chromosome.

For our purpose we have used grasshoppers, a traditional classic model system in cytogenetic studies. Concretely, we have analyzed the male meiosis in three species:

*Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* and *Stethophyma grossum*. All of them have a chromosome complement of 22 autosomes and sex chromosome determinism of XX in females and X0 in males. This last item let us to study a natural univalent, the X chromosome. Moreover, some individuals of *Eyprepocnemis plorans* show accessory chromosomes, also called B chromosomes, which appear in addition to the normal chromosome set. The selection of individuals with a single B chromosome has allowed us the study of another kind of natural univalent. Finally, the males of *Stethophyma grossum* show incomplete synapsis and chiasma localization in 8 bivalents. Jointly, in these three species of grasshopper we have studied different kind of chromosomes: bivalents with complete synapsis, bivalents with incomplete synapsis and chiasma localization and natural univalents, the X and B chromosomes. There are in the literature several studies where the synaptic patterns displayed by all of these chromosomes and their segregation have been reported. However, there are no studies regarding to the localization of the cohesins and/or the timing of recombination and synapsis, and the location of proteins during early recombination events. In this Thesis we fill this gap presenting new data that contribute to elucidate the localization, loading and release of different subunits of the cohesin complex during grasshopper meiosis, and also investigate the role of the cohesins in special meiotic situations such as partial synapsis and restriction of recombination.

We have analyzed the dynamic and localization of four different cohesin subunits: SMC3, SMC1 $\alpha$ , SA1 and RAD21. The analysis of SMC3 and SMC1 $\alpha$  let us to follow the progression of synapsis during the prophase I. Moreover, we have analyzed two proteins which are involved in the first steps of recombination:  $\gamma$ -H2AX and RAD51. Also we have studied the location of a histone modification, the trimethylation of the histone 3 in its lysine 9 (H3K9me3). This modification of the chromatin is related to heterochromatin in mammals. To do that, we have mainly used indirect immunofluorescence with specific antibodies over squashed and spread spermatocytes. The squashing of spermatocytes keeps the volume of the cells and then the chromosomal structure. This technique is especially useful not only in the analysis of the structure of the meiotic chromosome in order to know the specific localization of

different proteins, but is also useful to analyze the relative position of two different proteins in the cell.

The analysis of the location of different subunits of the cohesin complex during the prophase I reveals a sequential loading of them. Thus, SMC3 and SMC1 $\alpha$  form axes from leptotene whereas RAD21 and SA1 are loaded at zygotene, onto synapsed chromosome regions. In later stages, in condensed metaphase I chromosomes, we detect the four cohesins into the interchromatid domain of those chromosomes that achieve synapsis at pachytene, although they do not fully colocalize. Moreover, we observe that RAD21 and SA1 are lack from interchromatid domain of X chromosome and of those chromosomal regions which remain unsynapsed at pachytene. Thus, it seems to exist a relationship between the presence of some cohesin subunits in metaphase I chromosomes and their previous synaptic history during prophase I. This finding prompted us to speculate that the presence of some cohesin subunits could be related with the assembly of synaptonemal complex. On the other hand, we have observed that the release of the cohesin subunits studied occurs sequentially as well. Thus, the labelling of RAD21 is lost in the metaphase I – anaphase I transition, but SMC3 and SMC1 $\alpha$  are still detected until telophase I and SA1 is present at kinetocores until telophase II. From all these data, we infer the existence of different cohesin complexes in grasshopper male meiosis.

Regarding to the chromosome structure in meiosis, we discuss the relative position of the cohesins into the meiotic chromosome. We have generated a possible working model in which we propose a relocation of the cohesins from a position at the base of chromatin loops at pachytene to a location which would occupy the entire contact surface between sister chromatids at metaphase I.

On the other hand, we studied the temporal relationship between the beginning of recombination and synapsis. To date, at least two different situations have been described. In budding yeast, mouse and *Arabidopsis thaliana* the initiation of synapsis is dependent on the previous occurrence of double-strand breaks. However, in other species such as *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*, recombination events are delayed until synaptonemal complex has been completed. We have analyzed in grasshoppers the progression of synapsis by means of the localization of SMC3, a

cohesin closely related to the axial elements of the chromosomes and we have detected the first steps of recombination with specific antibodies against  $\gamma$ -H2AX and RAD51. The results obtained indicate that the initiation of recombination precedes synapsis.

Previous data regarding to the meiosis of *Stethophyma grossum* males described the presence of restricted synapsis and chiasma localization in the 8 longest bivalents. We have analyzed the evolution of cohesin axes during the prophase I and have detected a nuclear region which is advanced in the cohesin axis maturation in relation to the rest of the nucleus. Our results also point out to the existence of a relationship between the temporal displacement of cohesin axis maturation and the partial synaptonemal complex formation, being those advanced chromosomal regions which present synapsis. We have also found that the double-strand breaks are restricted to those chromosomal regions which present advanced cohesin axis maturation. Furthermore, we have observed that chromatin which suffers the double-strand breaks is related to the histone modification H3K9me3. Therefore, this bizarre system let us to relate a differential maturation of cohesin axes with restrictions of both, recombination and synapsis, and that these phenomena are polarized into the nucleus and related to the chromatin composition. In order to analyze the relationships among all those events more deeply, *Stethophyma grossum* males were subjected to a gamma rays treatment to generate double-strand breaks in the whole nuclear chromatin. Our results indicate that, despite the generation of homogeneous DNA damage, this system do not change its synaptic and chiasma localization patterns. Moreover, we observed that the recombinase RAD51, which is implicated in double-strand breaks repair, is preferably recruited over the chromatin modified in H3K9me3.

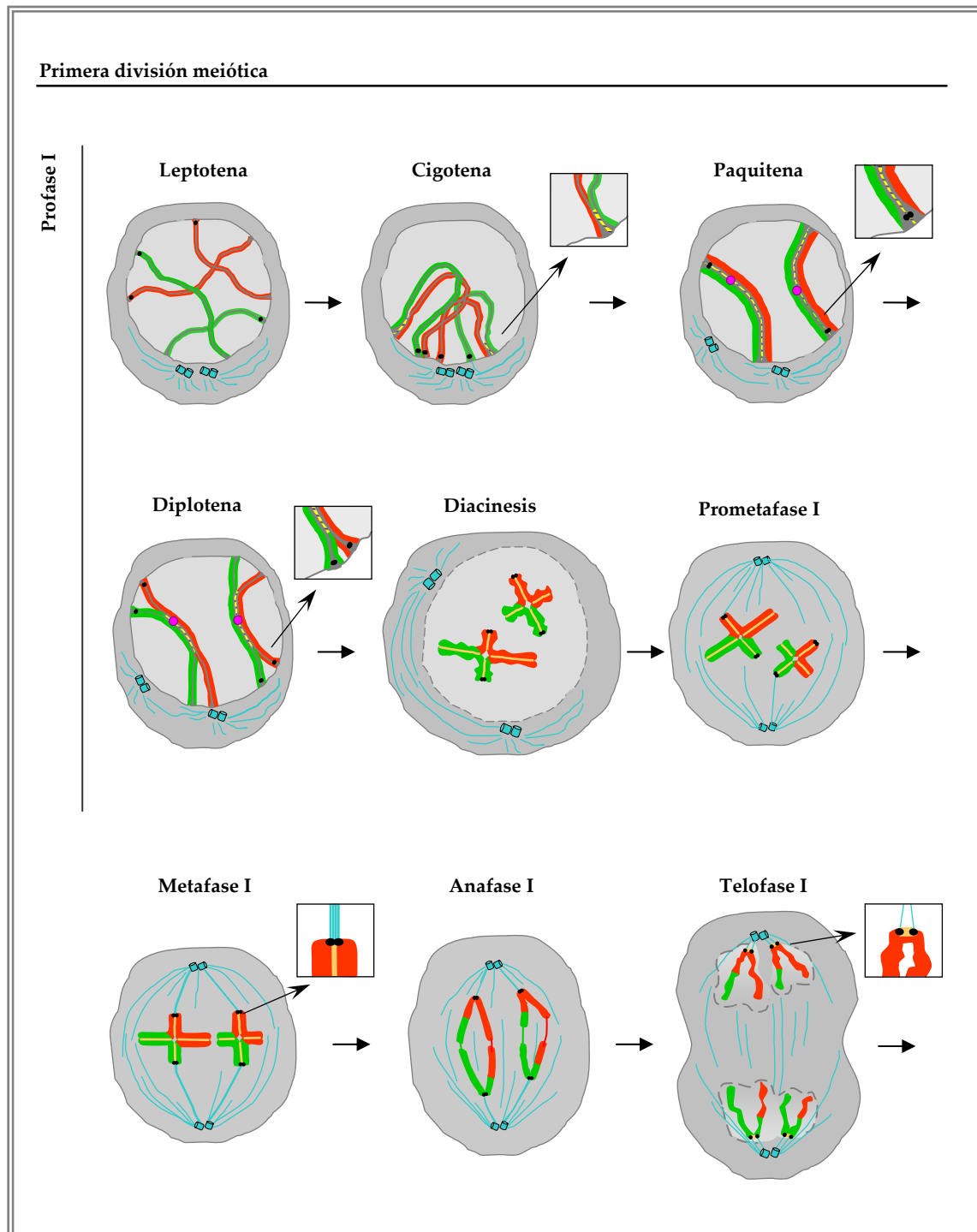
In summary, the results obtained indicate the existence of different cohesin complexes in grasshopper meiosis and the presence of different cohesin subunits could be related to the synaptic history of each chromosome. We propose that grasshoppers can display the same temporal model of recombination and synapsis relationship than mouse, yeast and *Arabidopsis thaliana*. We also discuss the importance of the cohesin axis maturation for a proper progression of recombination and synapsis and suggest a possible special role of the nuclear organization and the chromatin composition in these processes.



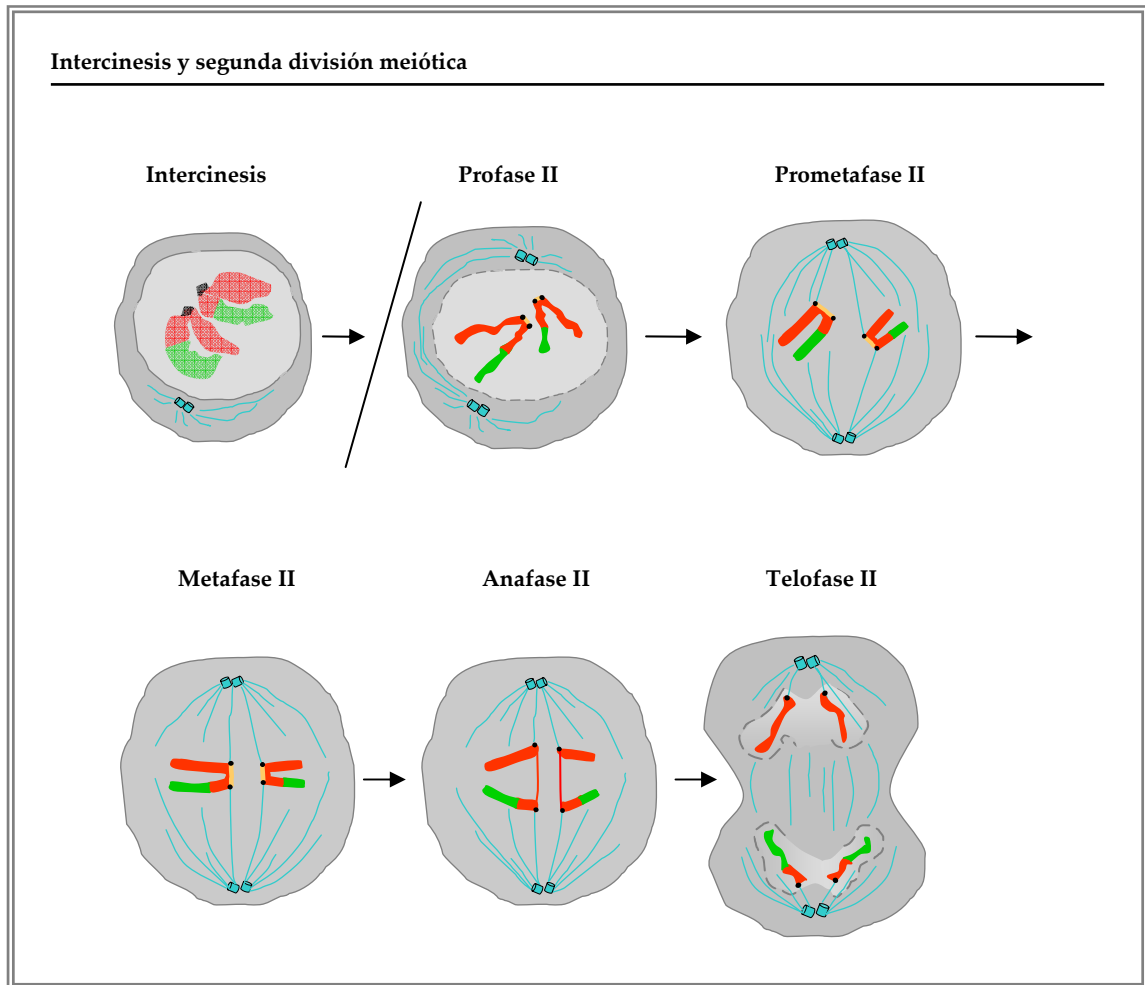


La generación de gametos en los organismos con reproducción sexual depende de un tipo especializado de división celular denominada meiosis, específico de las células de la línea germinal. El término “*meion*”, del cual deriva la palabra meiosis significa “reducción”, y es que tras la meiosis se obtienen células haploides, con la mitad de cromosomas que las células somáticas, genéticamente distintas entre sí y distintas a la célula original. La fusión de un gameto femenino y un gameto masculino en la fecundación, reconstituirá el número cromosómico propio de la especie en un nuevo individuo. En la meiosis, tras una única ronda de replicación de ADN, se producen dos divisiones sucesivas denominadas: primera división meiótica y segunda división meiótica. Atendiendo a la segregación de los cromosomas, en la mayoría de los organismos estudiados hasta la fecha, la primera división meiótica es reduccional segregando cromosomas homólogos a polos opuestos y la segunda división meiótica es ecuacional, donde segregan cromátidas hermanas (revisado en (Petronczki y col., 2003). Ambas divisiones se subdividen en: profase, metafase, anafase y telofase I o II, dependiendo de la división meiótica que tengamos en cuenta y están separadas por un periodo conocido como intercinesis (Fig. 1).

A lo largo de la meiosis se suceden, superponen y coordinan diferentes procesos que dan lugar a la asociación de cromosomas homólogos en bivalentes en la primera profase meiótica y al correcto reparto del material genético en anafase I y anafase II. Algunos de los procesos más importantes son: el alineamiento, apareamiento y reconocimiento de cromosomas homólogos, la recombinación e intercambio de material genético entre cromátidas homólogas, la sinapsis, la disociación selectiva y secuencial de la cohesión entre cromátidas hermanas y por supuesto una correcta segregación cromosómica. Fallos en el proceso meiótico o en su regulación dan lugar a aneuploidías y otro tipo de anomalías cromosómicas que conllevan desde la esterilidad del individuo, hasta malformaciones en el embrión si se llega a culminar la fecundación. En la actualidad hay diversos grupos de investigación que estudian la meiosis desde muchos puntos de vista. Este trabajo está enfocado principalmente al estudio citogenético de la meiosis en saltamontes, a describir y dilucidar las relaciones existentes entre el complejo de cohesina, la recombinación y la sinapsis, así como a indagar en la organización y estructura del cromosoma meiótico.







**Figura 1: Etapas de la meiosis.** Esquema representativo de las diferentes etapas acontecidas en la división meiótica. Los cromosomas paternos se representan en rojo y los maternos en verde. Se muestra la meiosis en dos parejas de cromosomas homólogos, uno mayor con un quiasma subproximal y otro menor con un quiasma intersticial. El citoplasma aparece en gris oscuro. Los núcleos se han marcado en gris claro. Los microtúbulos y los centriolos se dibujan en azul. Los centrómeros se representan como esferas negras. Los elementos axiales/laterales de los cromosomas se han dibujado en gris. En el detalle agrandado de cigotena se muestra el inicio de la sinapsis. El elemento central del complejo sinaptonémico se ha dibujado en amarillo. En el detalle agrandado de cigotena, paquitena y diplotena se muestran los engrosamientos de los elementos laterales denominados placas de asociación. Las bolitas rosas en paquitena y diplotena identifican los núcleos de recombinación tardíos sobre el punto de quiasma. El detalle del bivalente en metafase I y telofase I representa la orientación sintética de los cinetocoros hermanos (pareja de esferas negras). El esquema original ha sido realizado por Rocío Gómez y se utiliza bajo su autorización.

## 1. Etapas de la meiosis.

### 1.1. Primera división meiótica.

La primera división meiótica se caracteriza por la interacción de las parejas de cromosomas homólogos en profase I, seguido de la orientación de los bivalentes en metafase I y culmina con una segregación reduccional en anafase I.

La **profase I** se caracteriza por el alineamiento, el apareamiento de los cromosomas homólogos y la formación de una estructura tripartita de naturaleza proteica llamada Complejo Sinaptonémico (CS), la cual asocia físicamente a los cromosomas homólogos. Al conjunto de los dos cromosomas homólogos se le denomina bivalente. La formación del CS, en un proceso conocido como sinapsis, y su posterior desorganización da lugar a la clasificación por etapas de la profase I, las cuales se denominan: leptotena, cigotena, paquitena, diplotena y diacinesis (Fig. 1). Además, a lo largo de la profase I tiene lugar la recombinación entre cromosomas homólogos, dando lugar al intercambio de material genético, cuya visualización citológica son los quiasmas.

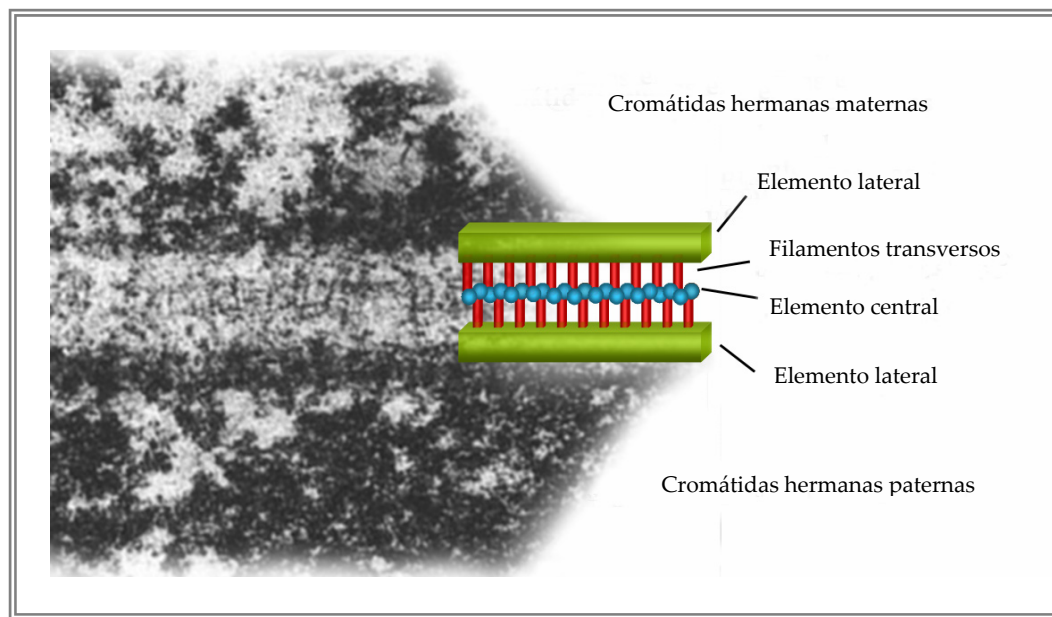
En **leptotena** cada cromosoma, con sus dos cromátidas, forma un eje proteico al que se anclan las dos moléculas hermanas de ADN presentes tras la replicación y que recorre toda la longitud del cromosoma. Este eje se denomina elemento axial (EA) (Zickler y Kleckner, 1999; Stack y Anderson, 2001) y es el precursor del elemento lateral (EL) del CS que aparecerá a partir de cigotena entre cromosomas homólogos. En mamíferos los principales componentes de los EA son las proteínas SYCP2 y SYCP3 (Proteína del complejo sinaptonémico 2 ó 3: "*Synaptonemal Complex Protein 2 or 3*") (Moens y col., 1987; Dobson y col., 1994; Moens, 1994; Heyting, 1996). Los cromosomas homólogos están anclados a la envoltura nuclear por los telómeros. En los puntos de anclaje a la envoltura nuclear de los cromosomas, estos componentes de los EA se engrosan dando lugar a las placas de asociación (Esponda y Giménez-Martín, 1972). De esta forma, siempre con los telómeros asociados a la envoltura nuclear, los cromosomas se mueven en el núcleo en lo que se conoce como alineamiento presináptico. Se considera que el alineamiento presináptico facilita las interacciones entre cromosomas homólogos (apareamiento) y su posterior asociación física mediada por el CS (sinapsis), sugiriendo que la organización nuclear de los cromosomas en el núcleo no es al azar

(Scherthan y col., 1996). Aunque el apareamiento homólogo aumenta en las primeras etapas de la meiosis, existen evidencias en *Schizosaccharomyces pombe* de que cromosomas homólogos comparten espacio dentro del núcleo incluso antes de entrar en división meiótica y esto podría servir para facilitar un apareamiento más específico en meiosis (Scherthan y col., 1994; Wells y col., 2006). Como parte de este movimiento cromosómico, en muchos organismos los telómeros de los cromosomas quedan polarizados en una región de la envoltura nuclear, constituyendo lo que se conoce como organización en “bouquet” o ramillete. En muchas especies, esta organización ocurre en la etapa que se considera de transición entre leptotena y cigotena (Scherthan y col., 1996; Zickler y Kleckner, 1998; Davis y Smith, 2006).

En **cigotena** se produce la asociación física de los cromosomas homólogos mediante el CS, el cual se compone de dos EL, uno por cromosoma homólogo y un elemento central (EC), unidos por filamentos transversos (FT) (Fig. 2) (Moses, 1956; Moens, 1969; Heyting y col., 1985; Schmekel y Daneholt, 1995; Heyting, 1996; Zickler y Kleckner, 1999; Page y Hawley, 2004). La sinapsis es un proceso progresivo, cuyo punto o puntos de inicio varía según las especies. La estructura del CS está evolutivamente bien conservada, estando presente desde protistas hasta humanos (Page y Hawley, 2004). Aunque hay excepciones, como la de *S. pombe*, donde no se conoce la formación de un CS como tal. No obstante, en esta especie existen proteínas que forman elementos lineales que recuerdan a los EL y que parecen tener una función en el apareamiento cromosómico durante la profase I meiótica (Bähler y col., 1993; Lorenz y col., 2004).

Se denomina **paquitena** a la etapa de la primera profase meiótica en la que se concluye la sinapsis. En la mayoría de las especies, ese punto de sinapsis completa comprende la formación de CS a lo largo de toda la longitud de los cromosomas homólogos, al menos de los autosomas. En el par sexual en los machos de ratón y humanos, el CS sólo se forma en la región pseudoautosómica (PAR) de los cromosomas XY. En otros mamíferos, como es el caso de los machos de *Thylamys elegans*, el par sexual XY es asináptico, aunque se establece una asociación física entre el cromosoma X y el Y mediada por las mismas proteínas que forman el CS (Page y col., 2003). En este caso, el punto de sinapsis máxima no incluye a los cromosomas sexuales. Por otro lado, existen especies donde se ha descrito sinapsis incompleta. Es el caso de los machos de la especie

de saltamontes *Stethophyma grossum*, donde 8 de sus bivalentes presentan sinapsis parcial y dado que su determinismo cromosómico del sexo es XO, el cromosoma sexual actúa como univalente natural y nunca presenta sinapsis (Fletcher, 1977; Jones y Wallace, 1980). Por este tipo de casos, conviene diferenciar que paquitena sería la etapa donde se completa la sinapsis, entendida como el momento donde se alcanza la sinapsis máxima definida en esa especie y no como formación del CS en toda la longitud de los cromosomas homólogos.



**Figura 2. Esquema de los componentes del CS.** En verde se representan los dos elementos laterales, uno por cada cromosoma homólogo. Los rectángulos rojos esquematizan los filamentos trasversos. En azul se representa el elemento central. La parte de la izquierda es una fotografía del CS tomada al microscopio electrónico (Moen, 1969).

Evolutivamente la **composición molecular del CS** es heterogénea, habiéndose caracterizado diferentes proteínas en diversas especies. En hembras de *Drosophila melanogaster* se clasificó a la proteína C(2)M como componente del CS, necesaria para el ensamblaje de C(3)G, posible componente de los FT. Por lo tanto se considera que C(2)M tendría una función similar a lo que sería el EL de los cromosomas (Manheim y McKim, 2003). En mamíferos, los componentes de los EA, las proteínas SYCP3 y SYCP2, son también los componentes de los EL y a la proteína SYCP1 (Proteína del complejo sinaptonémico 1: “*Synaptonemal Complex Protein 1*”) se la considera un componente de los FT (Page y Hawley, 2004). Estudios de inmunolocalización en ratón demuestran que tanto SYCP3 como SYCP2 se localizan a lo largo de los EA de los cromosomas y

posteriormente en los EL del CS en profase I (Parra y col., 2004b). La localización de SYCP1 se restringe a las regiones que han completado la sinapsis, observándose entre los dos EL (Meuwissen y col., 1992; Liu y col., 1996; Schmekel y col., 1996). Como componentes del EC en mamíferos se conoce a las proteínas SYCE1, SYCE2 ("*Synaptonemal Complex Central Element 1 y 2*") y TEX12 ("*Testis Expressed Sequence 12*"). Las tres proteínas dependen de SYCP1 para su incorporación en cigotena (Costa y col., 2005; Hamer y col., 2006).

El estadio de **diplotena** comienza con el desensamblaje del CS, progreso conocido como desinapsis. Es un proceso gradual en el que el EC y los FT del CS se desorganizan de forma no lineal en la mayoría de las especies, observándose distintos puntos simultáneos de desensamblaje del CS. En mamíferos es típico observar burbujas u horquillas de desinapsis. En dichas burbujas sigue detectándose a los componentes de los EL, SYCP2 y SYCP3, pero no se detectan proteínas del EC y los FT (Parra y col., 2004b; Costa y col., 2005; Hamer y col., 2006). En saltamontes se ha observado que el CS en su totalidad se fragmenta en diferentes puntos a lo largo de la longitud de los cromosomas homólogos, no observándose burbujas o una imagen de apertura en cremallera (Rufas y col., 1992).

Una vez completado el desensamblaje del CS la célula entra en la etapa de **diacinesis**, donde los cromosomas homólogos tan sólo quedan unidos por los quiasmas, aunque es conocido que algunos componentes de los EL como SYCP3 permanecen en la estructura cromosómica en mamíferos (Parra y col., 2004b). Las cromátidas hermanas mantienen su unión gracias a las cohesinas. En esta etapa se produce la rotura de la envoltura nuclear, permitiendo el anclaje de los microtúbulos a los cinetocoros. A partir de este momento y hasta que los bivalentes se alinean en la placa metafásica se dice que los cromosomas están en una etapa intermedia denominada **prometafase I**. Una vez todos los bivalentes quedan alineados, con los centrómeros homólogos orientados a polos opuestos, se considera estrictamente que la célula está en **metafase I**. En este momento de la meiosis los dos cinetocoros hermanos actúan como uno, favoreciendo una orientación sintética y biorientando al bivalente (detalle de metafase I en Fig.1). La estabilización del bivalente y la correcta orientación de los cinetocoros en esta etapa depende de la recombinación recíproca ocurrida durante la profase I y de la cohesión

entre cromátidas hermanas. En cada par de cromosomas homólogos debe haberse formado al menos un quiasma para asegurar que cada bivalente actúe como una unidad, es lo que se conoce como punto de quiasma obligado (Jones y Franklin, 2006). La compactación de la cromatina es progresiva durante la profase I, llegando los cromosomas a su máximo grado de compactación en la metafase I.

Una vez que el alineamiento en metafase I es correcto, se activan los mecanismos de segregación cromosómica y en **anafase I** migran cromosomas homólogos recombinados a polos opuestos, dando lugar a una segregación reduccional. Aunque se han descrito casos en los que la primera anafase meiótica es ecuacional, segregando cromátidas, es lo que se conoce como secuencia de meiosis invertida. Es el caso por ejemplo de la especie *Graphosoma italicum* (González-García y col., 1996; Viera y col., 2009a). El éxito de la segregación cromosómica depende de un mecanismo de control denominado punto de control de anclaje al huso, lo que en inglés se llama "*Spindle Assembly Checkpoint*" ("SAC"). El "SAC" inhibe la actividad del complejo promotor de anafase ("APC": "*Anaphase Promotor Complex*"), el cual desencadena la degradación de las proteínas que mantienen unidos a los cromosomas homólogos (Peters, 2006). Una vez los cromosomas homólogos han migrado completamente a polos celulares opuestos, se considera que la célula está en **telofase I**. A la completa segregación le sigue un proceso de descompactación de la cromatina, separación de la célula inicial en dos células hijas y la reconstitución de la envoltura nuclear en cada nuevo núcleo. Este proceso se conoce como **intercinesis**, en el cual nunca ocurre replicación del ADN. En algunos casos es tan rápido que los cromosomas pasan directamente de telofase I a la segunda división meiótica. En este punto, cada célula tras la telofase I portará la mitad de cromosomas del complemento de la especie, por lo tanto serán haploides.

## 1.2. Segunda división meiótica.

Tras la intercinesis existe un periodo de recondensación de la cromatina que se conoce como **profase II**. Es muy probable que en esta etapa ocurran procesos de reorganización de proteínas y estructuración cromosómica para poder afrontar la siguiente segregación. Una vez se produce la ruptura de la envoltura nuclear, los cromosomas entran en contacto con los microtúbulos del huso en la **prometafase II** y

cuando quedan alineados en placa, con los cinetocoros hermanos orientados a polos opuestos (orientación anfitélica), decimos que estamos en **metafase II** (detalle en metafase II de Fig. 1). Tras pasar el punto de control de la placa metafásica, la segregación cromosómica en **anafase II** se activa por un proceso similar al de anafase I, pero esta vez se separan cromátidas hermanas. En **telofase I** se completa la migración de las cromátidas hermanas a polos opuestos y se descondensa la cromatina, se reconstituye la envoltura nuclear y se forman cuatro células haploides, con la mitad de cromosomas que la célula madre, genéticamente distintas entre sí y distintas a la célula original (Petronczki y col., 2003) A partir de aquí sigue un proceso de especialización celular para dar lugar a gametos funcionales.

El progreso de la meiosis es básicamente igual en machos y hembras. Sin embargo, en las hembras de diferentes especies, entre ellas todos los mamíferos, la meiosis no ocurre de manera continuada. La meiosis femenina se inicia durante el desarrollo embrionario en un número limitado de células germinales y se para en la etapa de diplotena, quedando en un estado de latencia denominado dictiotena. Una vez alcanzada la madurez sexual continúa el proceso de división meiótica, dando lugar por cada gonio que entra en división a dos células haploides pero desiguales funcionalmente. Sólo una de ellas continuará con la segunda división meiótica hacia la formación de un gameto funcional, pero se detendrá el proceso en metafase II. Sólo en el momento de la fecundación se eliminará el bloqueo, continuando con la segunda división meiótica hacia anafase II, cuyo resultado es de nuevo desigual, una de las células hijas queda sin función. Por lo tanto, en hembras, tan sólo una de las células resultantes de la meiosis producirá un gameto funcional, frente a la meiosis masculina donde las cuatro células resultantes de la división meiótica son potencialmente espermatozoides (Carlson, 2000).

## **2. La Cohesión.**

La cohesión entre cromátidas hermanas se establece en el periodo S del ciclo celular, al producirse la replicación de ADN (Miyazaki y Orr-Weaver, 1994; Uhlmann y Nasmyth, 1998). En un principio la cohesión fue descrita como el proceso que se opone a

la fuerza ejercida por los microtúbulos para separar las cromátidas hermanas. Las cohesinas serían por tanto aquellas proteínas que previenen una posible separación prematura de cromátidas (Michaelis y col., 1997). Fallos en el establecimiento de la cohesión, en su mantenimiento o liberación pueden dar lugar a aneuploidías o muerte celular como consecuencia de fallos en la segregación cromosómica. Se han descrito diversas proteínas que podrían estar implicadas de alguna manera en la cohesión de cromátidas hermanas, como es por ejemplo la SYCP3 en meiosis (Parra y col., 2004b) o la proteína centromérica INCENP ("INNer CENtromeric Protein", proteína centromérica interna) (Cooke y col., 1987; Parra y col., 2003). Sin embargo, la idea más aceptada hoy en día es que la cohesión, tanto en mitosis como en meiosis, está mediada principalmente por un complejo multiproteico conocido como complejo de cohesina (Revenkova y Jessberger, 2005; Peters y col., 2008).

## 2.1. Componentes del complejo de cohesina.

El complejo de cohesina está formado por cuatro subunidades, denominadas cohesinas, subunidades de cohesina o subunidades del complejo de cohesina. Dos de las subunidades son dos proteínas de la familia de las SMC ("Structural Maintenance of Chromosome": mantenimiento estructural del cromosoma): SMC1 y SMC3, la cuales forman un heterodímero. A este heterodímero se le une una proteína  $\alpha$ -kleisina, SCC1, y una subunidad SCC3 ("Sister Chromatid Cohesión 1 or 3") (Guacci y col., 1997; Sumara y col., 2000; Haering y col., 2002; Gruber y col., 2003) (Fig. 3). La mayoría de los componentes del complejo de cohesina están bien conservados desde levaduras hasta humanos (Uhlmann, 2001). No obstante, en la literatura han sido nombrados de diferente manera dependiendo de la especie. Así por ejemplo, la subunidad SCC1, que fue descrita en mitosis en *S. cerevisiae*, también es conocida en este organismo como MCD1 (Guacci y col., 1997) pero se la denomina RAD21 en mamíferos, peces, *S. pombe*, *Xenopus laevis* y *D. melanogaster* (Losada y col., 2000; Tomonaga y col., 2000; Warren y col., 2000; Prieto y col., 2002; Iwai y col., 2004). REC8 es la variante meiótica de RAD21, descrita en mamíferos y levaduras (Watanabe y Nurse, 1999; Lee y col., 2002; Watanabe, 2004). Los parálogos de SCC3 en *X. laevis* y mamíferos se denominan SA1/STAG1 y SA2/STAG2 (Losada y col., 2000; Prieto y col., 2001). En *S. pombe* la cohesina SCC3 se



conoce como PSC3 y presenta una variante meiótica denominada REC11 (Kitajima y col., 2003). En mamíferos, esta cohesina también presenta una proteína específica de meiosis, la cual se denominó STAG3 (Pezzi y col., 2000; Prieto y col., 2001). Las proteínas SMC parecen ser las más conservadas evolutivamente, siendo el heterodímero de subunidades SMC el eje central del complejo de cohesina en plantas y animales (Hirano, 2006; Schubert, 2009). En mamíferos, se conoce un parálogo meiótico de la cohesina SMC1, la denominada SMC1 $\beta$ , desde el momento que ésta fue descrita, a la variante presente tanto en mitosis como en meiosis se la conoce como SMC1 $\alpha$  y ha sido detectada hasta diplotena en meiosis (Revenkova y col., 2001). En peces ocurre algo parecido, se conoce una variante específica de las células germinales, la denominada MeSMC1b, pero la variante MeSMC1a está presente tanto en mitosis como en meiosis (Iwai y col., 2004). El hecho de que se conozcan variantes meióticas de algunas de éstas proteínas, sólo implica que estas proteínas están específicamente en meiosis, pero en muchos casos la variante que está presente en mitosis también lo está en meiosis. Es el caso de RAD21 y REC8, ambas están presentes en la meiosis de mamíferos (Prieto y col., 2001; Lee y col., 2003; Parra y col., 2004b). Lo mismo ocurre con STAG2, la cual tiene un parálogo meiótico, STAG3, pero ambas coexisten en meiosis (Prieto y col., 2001).

En la tabla 1 se resumen diferentes subunidades del complejo de cohesina en función de la especie y del tipo de división celular.

## 2.2. Dinámica del complejo de cohesina.

En los últimos años se habla de la dinámica del complejo de cohesina, en el sentido de que la composición del mismo no siempre es la misma. Ésta depende no sólo del tipo de división celular, sino que además diferentes complejos de cohesina coexisten en una misma célula en un mismo momento. Apoyando esta idea se ha descrito en los peces de la especie *Oryzias latipes* (peces Medaka: “*Medaka fish*”) la existencia de dos complejos de cohesina meióticos, uno que incluye a MeRAD21 y otro donde dicha cohesina está ausente (Iwai y col., 2004). En *X. laevis* y mamíferos los parálogos de SCC3, SA1/STAG1 y SA2/STAG2, ocupan el mismo lugar dentro del complejo de cohesina y por tanto no coexisten, entendiendo que forman parte de complejos de cohesina

diferentes (Losada y col., 2000; Prieto y col., 2001). Por otro lado en *S. pombe* existen al menos dos complejos de cohesina en meiosis, uno de ellos estaría compuesto por PSM1, PSM3 (las equivalentes a SMC1 y SMC3), REC8 y PSC3 (SCC3) y otro donde PSC3 es sustituida por REC11, cada uno de ellos asociado al dominio pericentromérico y al braquial respectivamente (Kitajima y col., 2003). En mamíferos el complejo de cohesina formado por SMC1 $\alpha$ , SMC3, REC8 y STAG3 ejercería su función en meiosis sólo en la cohesión braquial, frente a aquel donde SMC1 $\alpha$  es sustituida por SMC1 $\beta$ , el cual podría estar implicado tanto en cohesión braquial como en cohesión centromérica (Revenkova y Jessberger, 2006). Con estos datos cabe pensar que en la composición de los complejos de cohesina existe una especialización funcional, más allá del tipo de división celular que se lleve a cabo, (Suja y Barbero, 2009).

**Tabla 1: Proteínas del complejo de cohesina.**

Especie	Mitosis	Meiosis
<i>S. cerevisiae</i>	SMC1 SMC3 SCC1 o MCD1 SCC3	SMC1 SMC3 REC8 SCC3
<i>S. pombe</i>	PSM1 PSM3 RAD21 PSC3	PSM1 PSM3 REC8 PSC3/REC11
<i>C. elegans</i>	HIM-1 SMC3 COH-2 o SCC1 SCC3	PSM1 PSM3 REC8 SCC3
<i>D. melanogaster</i>	SMC1 SMC3 DRAD21 DSA1	SMC1 SMC3 - MNM/DSA2
<i>X. leavis</i>	XSMC1 XSMC3 XRAD21 XSA1/XSA2	XSMC1 XSMC3 XREC8 -
<i>O. latipes</i>	MeSMC1a MeSMC3 MeRAD21 -	MeSMC1a/b MeSMC3 MeRAD21/- -
Mamíferos (Ratón/Humano)	SMC1 $\alpha$ SMC3 RAD21 STAG1/2	SMC1 $\alpha$ / $\beta$ SMC3 RAD21/REC8 STAG3

Cuando se especifican dos cohesinas separadas con la letra "o", indica diferentes nomenclaturas para la misma cohesina. Cuando dos cohesinas están separadas por una barra (/), indica que diferentes subunidades forman parte de distintos complejos de cohesina pero ambas estas presentes en ese tipo de división celular.

### 2.3. Cofactores del complejo de cohesina: complejo de cohesión.

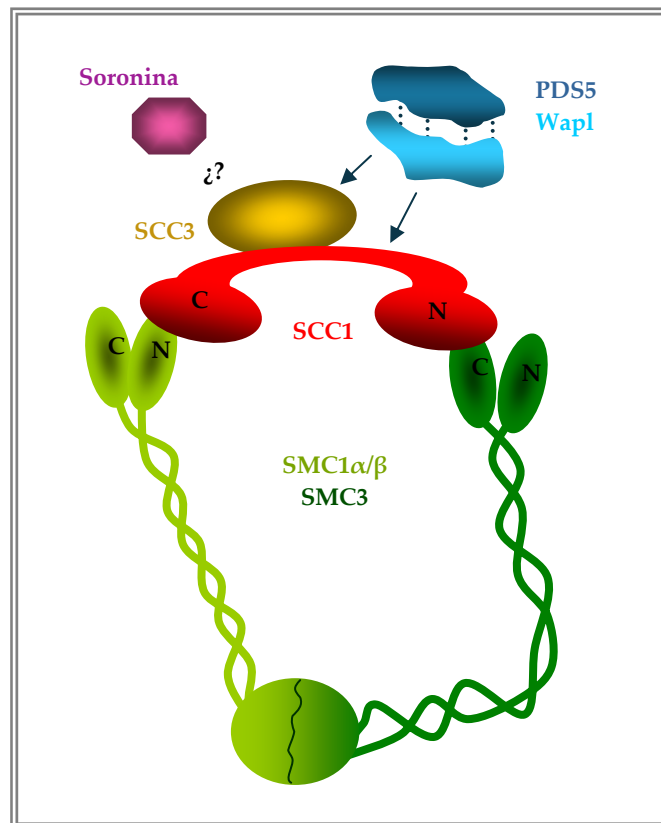
Además de los componentes del complejo de cohesina, se han identificado tres proteínas asociadas a este complejo multiproteico, los llamados cofactores de cohesión: PDS5, Wapl y Soronina (“*Soronin*”). Su importante papel en el establecimiento, mantenimiento y liberación de la cohesión nos ha llevado a nombrar al conjunto del complejo de cohesina y dichos cofactores: complejo de cohesión. Por lo tanto, de aquí en adelante, cuando hablemos de complejo de cohesina nos referiremos al núcleo del complejo de cohesina: SMC1/SMC3/SCC1/SCC3; pero cuando hablemos de complejo de cohesión, debemos añadir los tres cofactores: Pds5, Wapl y Soronina (Fig. 3).

El homólogo de PDS5 en *Sordaria macrospora* se denominó Spo76 (van Heemst y col., 1999) y en *Aspergillus nidulans* BimD (Denison y col., 1993). En vertebrados se han descrito dos homólogos, PDS5A y PDS5B (Losada y col., 2005). La secuencia de todos ellos está evolutivamente conservada (Panizza y col., 2000). El papel de PDS5 en el complejo de cohesión estaría relacionado con el mantenimiento y la modulación de la cohesión (Panizza y col., 2000). La acumulación de PDS5 sobre los cromosomas ocurre en el periodo S (Peters y col., 2008), periodo en el que se establece la cohesión entre las cromátidas hermanas (Uhlmann y Nasmyth, 1998). Una mutación en *pds5* da lugar a separación prematura de los cromosomas en meiosis de levaduras (Zhang y col., 2005). A PDS5 en vertebrados se le confiere un papel en la modulación de la interacción del complejo de cohesina con la cromatina (Tanaka y col., 2001; Losada y col., 2005). La interacción tanto de PDS5A como de PDS5B con las subunidades del complejo de cohesina es altamente específica (Losada y col., 2005). En meiosis de levaduras se ha propuesto a PDS5 como posible modulador de la actividad de REC8 y su actividad influye en la sinapsis de cromosomas homólogos (Jin y col., 2009).

PDS5 interactúa con Wapl para formar un complejo, el cual se asocia con el complejo de cohesina mediante la subunidad SCC3 (SA1/SA2) o SCC1 (Gandhi y col., 2006; Sutani y col., 2009). Wapl es el nombre de dicho cofactor de cohesión en vertebrados, pero en levaduras se le conoce como Wpl1 o RAD61 (Sutani y col., 2009). Al igual que PDS5, la actividad de Wapl en vertebrados se relaciona con las interacciones necesarias entre el complejo de cohesina y la cromatina, concretamente se le confiere un importante papel en la liberación de la cohesión (Gandhi y col., 2006;

Kueng y col., 2006) Algo similar ha sido observado en *S. pombe*, pero no así en *D. melanogaster*, donde parece estar relacionada específicamente con la cohesión en regiones de heterocromatina (Verni y col., 2000; Peters y col., 2008). Fue precisamente en *D. melanogaster* donde se describió por primera esta proteína, cuyo nombre deriva de la definición “Wings APart-Like”, y se la relacionó con el mantenimiento de la unión de cromátidas hermanas en la heterocromatina mitótica. Mutaciones en el gen *wapl* derivan en cambios en la estructura del cromosoma mitótico (Verni y col., 2000).

Poco se sabe hasta el momento de la forma de interacción de la Soronina con el complejo de cohesina. Sólo se ha descrito en vertebrados y parece esencial para la cohesión entre cromátidas hermanas (Peters y col., 2008) (Fig. 3).



**Figura 3. Esquema del complejo de cohesión.** Formado por los componentes del complejo de cohesina: SMC1α/β, SMC3, SCC1 y SCC3, más los cofactores de cohesión: Wapl, PDS5 y Soronina.

#### 2.4. Organización estructural del complejo de cohesina y su interacción con el ADN.

El modelo de organización más aceptado describe que el complejo de cohesina se organiza a partir de un heterodímero formado por las dos subunidades SMC, las cuales conforman una estructura en forma de horquilla. Cada subunidad se dobla sobre sí

misma dando lugar a enrollamientos antiparalelos del tipo “*coiled-coil*”, creando un dominio de unión a ATP en un extremo y un dominio bisagra en el otro, quedando los extremos amino y carboxilo terminales de cada proteína asociados (Saitoh y col., 1994; Haering y col., 2002) (Fig. 3). La subunidad SCC1 une las cabezas de las proteínas SMC1 y SMC3 para dar lugar a lo que se conoce como anillo de cohesina, siendo la subunidad SCC1 clave en la regulación del mismo (Uhlmann y col., 1999; Gruber y col., 2003; Haering y col., 2004; Hirano, 2006). Datos en levaduras muestran que los extremos amino y carboxilo terminal de la subunidad SCC1 se unen a las cabezas del heterodímero de SMC en el dominio ATPasa, concretamente el extremo amino se une a la subunidad SMC3 y el carboxilo a la SMC1 (Gruber y col., 2003). La asociación de SCC1 al heterodímero es dependiente de ATP (Arumugam y col., 2003). A la subunidad SCC1 se le une la subunidad SCC3 (Fig. 3). Los resultados observados tras el estudio de las interacciones de los distintos componentes del complejo de cohesina en cultivos de células HeLa, muestran que las cuatro subunidades inmunoprecipitan entre sí pero de forma dependiente de SCC3 (Zhang y col., 2008).

El modo exacto de interacción de los anillos de cohesina en relación a la molécula de ADN se desconoce actualmente. Se han propuesto diferentes modelos, desde que un anillo de cohesina podría abarcar a las dos cromátidas hermanas después de la replicación (Nasmyth, 2005), hasta que la interacción de dos o más anillos de cohesina mantendría la cohesión entre ambas cromátidas hermanas (Losada, 2007). Recientemente se ha propuesto un modelo denominado “*Hardcuff cohesin complexes*” (complejos de cohesina en esposas) que postula que la interacción de dos anillos, formados por las subunidades SMC3, SMC1 y SCC1/RAD21, mediante una subunidad SCC3/SA1/SA2 mantendría la cohesión entre las dos cromátidas hermanas. En la replicación, dos heterodímeros formados por las subunidades SMC abrazarían cada uno una cromátida hermana. Dos subunidades SCC1/RAD21 cerrarían cada uno de esos heterodímeros formando un anillo y una única subunidad SCC3/SA1/SA2 interaccionaría con las dos subunidades SCC1/RAD21 dando lugar a una configuración que el autor ha denominado de “esposas” (Zhang y col., 2008).

## **2.5. Liberación de la cohesión. Mitosis vs Meiosis.**

La liberación de la cohesión es fundamental para la segregación cromosómica, ya que son los complejos de cohesina los que mantienen la estabilidad del bivalente en metafase. La liberación de la cohesión durante mitosis y meiosis difiere principalmente porque, en mitosis sólo ocurre una anafase, mientras en meiosis ocurren dos anafases seguidas, sin un periodo de replicación intermedio. En la anafase mitótica se separan las cromátidas hermanas, migrando cada una de ellas a polos opuestos, por lo tanto la cohesión no sería necesaria más allá de metafase. En meiosis, en anafase I segregan cromosomas homólogos, mientras que en anafase II segregan cromátidas, por lo tanto la unión de la cohesión entre las cromátidas hermanas deberá mantenerse hasta la segunda división meiótica. Este hecho implica que la liberación de la cohesión en meiosis está regulada en dos puntos distintos. En la anafase I se libera la cohesión a nivel braquial, permaneciendo unidas las cromátidas hermanas en el centrómero. En la anafase II se libera la cohesión centromérica y se separan completamente las dos cromátidas hermanas (Suja y col., 1992; Rieder y Cole, 1999; Suja y col., 1999; Uhlmann, 2001; Petronczki y col., 2003). La liberación de la cohesión en anafase, en mitosis y en meiosis, está mediada por la ruptura proteolítica de la subunidad SCC1 por una proteasa denominada Separasa, dando lugar a la apertura del anillo de cohesina, promoviendo la segregación cromosómica (Uhlmann y col., 1999; Uhlmann y col., 2000). La Separasa se activa en la transición metafase – anafase tanto en mitosis como en meiosis. Hasta entonces, esta proteasa permanece inactiva por unión a su inhibidor específico, la Securina (Ciosk y col., 1998). El complejo APC guía la ubiquitinación de la Securina, inhibiendo su actividad represora y activando así la Separasa (Uhlmann y col., 2000). Esta es la vía de liberación de la cohesión que permite la segregación cromosómica en anafase, pero se sabe que tanto en la profase mitótica como en la profase I de la meiosis de vertebrados se liberan parte de las cohesinas de los brazos cromosómicos por una vía independiente de Separasa (Sumara y col., 2000; Waizenegger y col., 2000; Parra y col., 2004b). En mitosis queda un resto de cohesión, principalmente a nivel de centrómero, el cual se libera en la transición metafase – anafase (Sumara y col., 2000). En meiosis, a pesar de la ligera liberación de cohesinas en la profase I las cromátidas hermanas se mantienen cohesionadas a nivel braquial y centromérico hasta metafase I, cumpliendo

así su función estabilizadora del bivalente y los cinetocoros hermanos permanecen unidos hasta metafase II (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Parra y col., 2004b). La liberación de la cohesión en meiosis, tanto en la transición metafase I – anafase I como en la transición metafase II – anafase II, ocurre vía Separasa (Uhlmann y col., 2000; Nasmyth, 2001). La necesidad de permanencia de cohesión centromérica tras la anafase I, hacen pensar en la existencia de una protección que asegure la cohesión hasta la segunda división meiótica. En levaduras de fisión se identificaron dos proteínas que actuarían como protectoras de la cohesión centromérica, la shugoshina 1 y la shugoshina 2 (Sgo1 y Sgo2) (Kitajima y col., 2004). Estas proteínas protegen a las cohesinas centroméricas de la acción de la Separasa en anafase I. En *D. melanogaster* se ha definido a la proteína MEI-S332 como la responsable de dicha función (Clarke y col., 2005).

### **3. La Recombinación.**

La recombinación meiótica permite el intercambio de material genético entre cromátidas no hermanas de cromosomas homólogos. Este proceso da lugar a parte de la variabilidad genética existente entre los individuos que presentan reproducción sexual, permitiendo que cada gameto tenga una información genética única. El proceso de recombinación se inicia con la formación programada de roturas de doble cadena en el ADN ("*DSB: Double-Strand Breaks*"), catalizadas por la enzima SPO11 (Keeney y col., 1997) homóloga de la Topoisomerasa II Top 6A de arqueas (Bergerat y col., 1997). Estudios en humanos y ratones apuntan a que los lugares de "*DSB*" no son al azar, sino que están especificados previamente en lo que se conoce como puntos calientes de recombinación (de Massy, 2003). El número de "*DSB*" que se producen al inicio de la meiosis es elevado, así por ejemplo, en ratón se han contabilizado alrededor de 300 y en *S. pombe* entre 150 y 300 (Moens y col., 2002; Young y col., 2002). Las "*DSB*" en meiosis se reparan principalmente por recombinación homóloga (RH). En *S. cerevisiae* se ha comprobado la existencia de dos vías de RH de las "*DSB*", obteniendo dos productos distintos en función de si hay intercambio de material genético entre cromátidas homólogas o no: sobrecruzamiento (SBC) o no sobrecruzamiento (NSBC) (Allers y Lichten, 2001; Hunter y Kleckner, 2001). De esta forma, si la rotura en el ADN se repara utilizando como molde la cromátida hermana dará lugar a NSBC. Sin embargo, si esa

reparación se realiza usando una cromátida homóloga como modelo se obtendrá SBC, lo que se conoce también como recombinación recíproca. Tanto en la vía de reparación hacia SBC como hacia NSBC ocurren procesos de invasión de hebra que pueden derivar en fenómenos de conversión génica (CG), lo que implica una donación de material genético de un cromosoma a otro (de Massy, 2003; Cromie y Smith, 2007). Los puntos de SBC se manifiestan citológicamente como quiasmas y juegan un papel fundamental en meiosis, contribuyendo a la estabilización del bivalente mediante una conexión física entre cromosomas homólogos (Petronczki y col., 2003). La decisión de la ruta de reparación de las “DSB” hacia SBC o NSBC ocurre muy temprano en el proceso de recombinación meiótica ocurrido en la profase I (Fig. 4), incluso antes de la estabilización de la invasión de hebra y los intermediarios de la recombinación necesarios (Bishop y Zickler, 2004), lo que implicaría que podría ocurrir en etapas de leptotena tardía o cigotena temprana en especies donde el inicio de la recombinación precede a la formación del CS. El hecho general de que en todos los organismos, el número de SBC que se observa es menor al número de “DSB” que se producen (de 10 a 50 veces mayor), hace pensar que la mayoría de las roturas se reparan por un proceso de recombinación no recíproca por la vía de NSBC (Anderson y col., 2001; Moens y col., 2002; Bishop y Zickler, 2004). No son pocos los estudios que profundizan en la relación existente entre el número de “DSB” y el número de SBC obtenidos al final del proceso de recombinación. Muchos de esos análisis utilizan métodos de generación de “DSB” de forma exógena, mediante tratamientos físicos como la irradiación con rayos gamma o tratamientos químicos con agentes como la cisplatina (Hanneman y col., 1997; Storlazzi y col., 2003; Sánchez-Morán y col., 2007).

### **3.1. Producción de “DSB” meióticas.**

La formación de “DSB” en meiosis por la acción de SPO11 ocurre en las primeras etapas de la profase I, en mamíferos y levaduras se han descrito en leptotena. SPO11 corta el ADN mediante una vía similar a las topoisomerasas y queda unida covalentemente a los extremos 5' libres (Lichten, 2001; Mahadevaiah y col., 2001; Neale y Keeney, 2006) (Fig. 4). Se ha demostrado que muchos organismos utilizan SPO11 o alguna enzima similar para producir las “DSB” meióticas y son dependientes de la



presencia de dicha enzima para dar lugar a productos recombinantes. En *C. elegans*, los mutantes *spo11<sup>-/-</sup>* sólo presentan univalentes, destacando la ausencia total de SBC entre cromosomas homólogos (Dernburg y col., 1998). Por su parte, en *D. melanogaster* se ha descrito que el gen *meiW68* codifica un producto homólogo a SPO11, cuyos mutantes no manifiestan recombinación meiótica (McKim y Hayashi-Hagihara, 1998). Los ratones *spo11<sup>-/-</sup>* presentan bloqueada la meiosis en cigotena y no se detectan proteínas implicadas en la reparación de “DSB”, indicando que éstas no se han producido (Baudat y col., 2000; Romanienko y Camerini-Otero, 2000). Un efecto similar de fallos en la recombinación y ausencia de bivalentes ocurre en *A. thaliana*, donde los mutantes para uno de los tipos meióticos del gen *spo11* existentes en esta plantas, *spo11-1*, raramente muestran bivalentes en metafase I, aunque la recombinación no se anula completamente (Grelon y col., 2001). Esto último podría deberse a que en esta especie se han descrito al menos dos tipos meióticos de SPO11, *AtSPO11-1* y *AtSPO11-2*, y aunque ambos parecen ser necesarios para catalizar las “DSB”, la falta de uno de ellos podría ser compensada por el otro (Hartung y Puchta, 2000; Grelon y col., 2001).

### 3.2. Señalización de “DSB” e incorporación de recombinasas.

Tras las “DSB” una rápida cascada de señalización es coordinada en el lugar de la lesión al ADN, donde cambios bioquímicos en la cromatina parecen tener un papel importante en la detección de los puntos de rotura para la posterior incorporación de las proteínas de reparación. Es el caso de la fosforilación de la histona H2A en la serina 129 en *S. cerevisiae* (Downs y col., 2004) o el de la variante H2AV de *D. melanogaster* fosforilada en la serina 137 (Madigan y col., 2002). En mamíferos, la variante H2AX se fosforila en la serina 139 dando lugar a la denominada  $\gamma$ -H2AX (Rogakou y col., 1998). Esta respuesta se extiende alrededor de 50Kb a cada lado del punto de rotura y parece ser fundamental para la incorporación de los factores de reparación y por tanto para la restauración del ADN (Rogakou y col., 1999; Paull y col., 2000; Lowndes y Toh, 2005). La inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX mediante anticuerpos específicos es una herramienta ampliamente utilizada para la detección de los lugares donde se han producido “DSB” meióticas (Mahadevaiah y col., 2001; Fernández-Capetillo y col., 2003; Kuo y Yang, 2008). Sin embargo, estudios recientes en ratones mutantes de *spo11*, muestran que no

todas las señales observadas en núcleos meióticos tras la inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX pertenecen a la respuesta de la acción de SPO11. Postulándose la existencia de dos olas de “DSB” en meiosis: dependiente e independiente de SPO11 (Chicheportiche y col., 2007).

La fosforilación de H2AX está mediada por proteínas de la familia PIKK (Kinasas del tipo fosfatidil inositol 3: “*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinases*”) como son ATM (“*Ataxia-Telangiectasia Mutated*”) y ATR (“*ATM and Rad3-related*”) (Paull y col., 2000; Burma y col., 2001; Ward y Chen, 2001). La kinasa ATM es activada tras las “DSB” e incorporada a los lugares de daño en el ADN fosforilando a H2AX, tras lo cual se incorporan MDC1 y el complejo Mre11 o MRN formado por las proteínas Mre11, Rad50 y Nbs1 que se une al extremo 5’ en el lugar de la rotura (Falck y col., 2005) los cuales interaccionan con ATM, amplificando la señal de fosforilación. Tras la señalización del lugar de “DSB” la actividad nucleasa del complejo Mre11 actúa sobre los extremos 5’, liberando a SPO11 (Lichten, 2001) (Fig. 4). A los extremos 3’ libres se unen RAD51 y DMC1, proteínas homólogas de la recombinasa bacteriana RecA e implicadas en los fenómenos de invasión de hebra y búsqueda de homología vía RH (Shinohara y col., 1997; Shinohara y Shinohara, 2004; Neale y Keeney, 2006). Mientras RAD51 está presente en la línea somática y la línea germinal, DMC1 es específica de células meióticas. Estudios en levaduras carentes de DMC1, muestran deficiencias en la recombinación meiótica interhomóloga, pero no parecen presentar problemas en resolver la RH vía cromátida hermana (Schwacha y Kleckner, 1997). Ambas recombinasas son necesarias para la recombinación meiótica y parecen actuar conjuntamente. (Bishop y col., 1992; Shinohara y col., 1992; Shinohara y Shinohara, 2004), aunque es conocido que en levaduras se incorporan a los lugares de “DSB” de forma independiente (Fukuda y Ohya, 2006). Se ha comprobado *in vitro* que se requiere tanto la participación de RAD51 como DMC1 para la invasión de hebra en la RH en meiosis (Petukhova y col., 2000; Gerton y Hawley, 2005; Neale y col., 2005). Aunque una sobreexposición de RAD51, en mutantes nulos de *dmc1*, reconstituye en gran medida los niveles de SBC, lo que evidenciaría la capacidad de RAD51 para mediar la invasión de hebra por si sola en determinadas condiciones (Tsubouchi y Roeder, 2003).

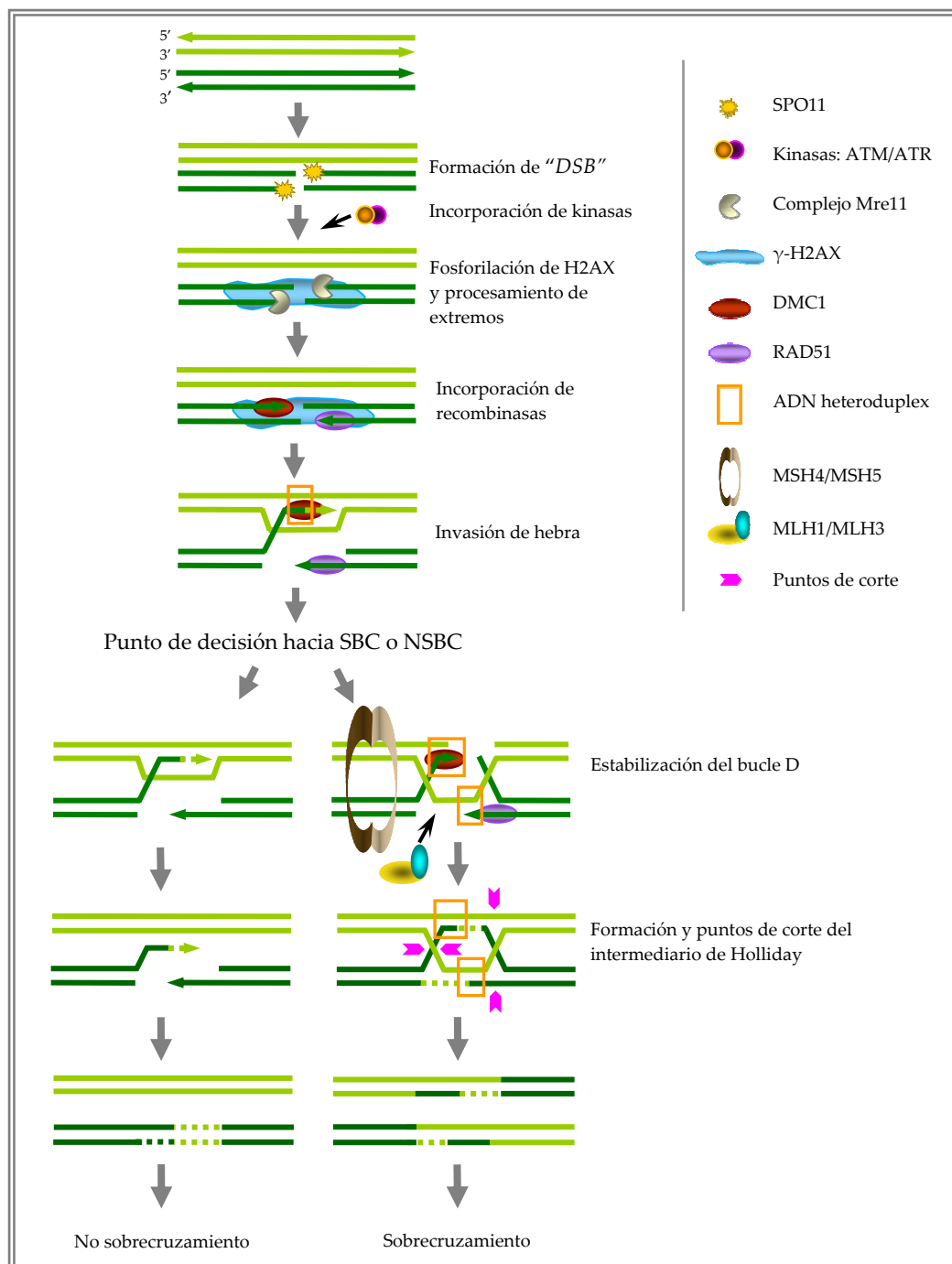
En espermatoцитos de ratón, tanto RAD51 (Ashley y col., 1995; Moens y col., 1997) como DMC1 dan lugar a múltiples focos en las etapas de leptotena y cigotena, formando complejos sobre los componentes del CS (Tarsounas y col., 1999). Uno de los modelos de acción más aceptado para las dos recombinasas es el de localización asimétrica, el cual implica el anclaje de RAD51 a un extremo 3' y la asociación de DMC1 al otro extremo 3' (Neale y col., 2005; Neale y Keeney, 2006). En meiosis la invasión de hebra debe realizarse sobre una molécula de ADN homóloga, se ha propuesto que DMC1 dirigiría a RAD51 hacia la recombinación inter-homóloga, en vez de hacia intercambio entre cromátidas hermanas como ocurre en línea somática, lo que ayudaría al reconocimiento de homología entre cromosomas (Masson y West, 2001).

### 3.3. Formación de intermediarios de Holliday y su resolución.

La invasión de hebra mediada por RAD51 y DMC1 tiene como resultado la formación de ADN heteroduplex, el cual está formado por la hebra simple de ADN que invade a la molécula de ADN homóloga. En este punto, en función de la molécula de ADN que se utilice como molde para la reparación, se decidirá si el resultado final será SBC o NSBC (Fig. 4). El modelo más aceptado para la formación de NSBC postula que la mayoría de las "DSB" no se resuelven por la vía de SBC, sino que lo hacen por la vía de hibridación dependiente de síntesis de hebra ("*SDSA: Synthesis-Dependent Strand Annealing*") (de Massy, 2003). Este mecanismo se lleva a cabo mediante una invasión de hebra transitoria en la cual el extremo 3' invasor podría ser extendido por síntesis de ADN usando como molde la molécula de ADN doble invadida. En este punto, la hebra invasora es expulsada y se une de nuevo con el extremo 5' de la misma hebra de ADN, utilizando como molde a partir de aquí la hebra hermana. Este tipo de reparación no implica la formación de lo que se conoce como intermediarios de Holliday, donde se forma un ADN heteroduplex doble, ni da lugar a quiasmas (Bishop y Zickler, 2004; Cromie y Smith, 2007; Terasawa y col., 2007) (Fig. 4). La vía de reparación de las "DSB" hacia SBC es un poco más compleja. En estos puntos, el ADN heteroduplex formado por la invasión del extremo 3' libre sobre la molécula de ADN de doble hebra homóloga, se estabiliza por exclusión de la hebra invadida, en lo que se conoce como estabilización del bucle de desplazamiento o bucle D. Esa estabilización parece depender, en

levaduras, de DMC1 (Bishop y col., 1992; Hunter y Kleckner, 2001) que podría cooperar en este punto con el complejo MND1-HOP2 (Gerton y DeRisi, 2002; Tsubouchi y Roeder, 2003). Una vez estabilizado el bucle D, comienza la síntesis de ADN desde el extremo 3' invasor, usando como molde la molécula de ADN homóloga, hasta enlazar con el otro extremo libre. En este punto, la hebra simple de ADN que ha sido excluida o desplazada tras la invasión del primer extremo 3' libre, hibrida con el segundo extremo 3', sirviendo como molde y produciéndose una nueva síntesis de ADN (Fig. 4). Tras el ligamiento de todos los extremos se produce lo que se conoce como intermediario de Holliday. Un modelo de corte asimétrico de las hebras de ADN y el ligamiento de hebras de polaridad similar, dará lugar a las cromátidas recombinantes (de Massy, 2003). La estabilización del bucle D y la formación del intermediario de Holliday son fundamentales para la resolución hacia SBC. En este proceso está implicado un heterodímero formado por dos proteínas del grupo ZMM, el complejo MSH4/MSH5 (Snowden y col., 2004). Una vez estabilizado, las proteínas MutL, MLH1 y MLH3, terminan de realizar el intercambio de material genético, dando lugar al SBC (Wang y col., 1999; Jackson y col., 2006).

Las proteínas implicadas en la vía de reparación de las "DSB" forman complejos proteicos conocidos como nódulos de recombinación (NR), los cuales se asocian con los EA/EL del CS y se han identificado desde protistas hasta plantas y animales. Los NR tardíos se componen principalmente de la proteína MLH1 y corresponden en número y localización con los puntos de quiasma en ratón (Moens y col., 2002). La composición de los NR no se restringe a las proteínas implicadas directamente en el reconocimiento de homología, invasión de hebra y resolución de la recombinación hacia SBC. Se ha observado que proteínas como RPA va reemplazando progresivamente a RAD51 y DMC1 en los nódulos tempranos en lo que se ha denominado nódulos transitorios (Moens y col., 2002).



**Figura 4: Modelo de recombinación meiótica.** Las líneas verde claro y verde oscuro representan moléculas de ADN homólogas. Sólo se esquematiza una cromátida por cromosoma homólogo. Arriba a la derecha se identifica cada uno de los símbolos presentes en la figura. Tras las "DSB" producidas por SPO11 la acción de kinasas específicas fosforilan a H2AX dando lugar a la variante γ-H2AX. Los extremos libres de ADN son procesados por el complejo Mre11 liberando a SPO11, tras lo cual las recombinasas RAD51 y DMC1 se anclan a los extremos 5' libres de forma asimétrica y median la invasión de hebra. Se sintetiza ADN tomando como molde la hebra homóloga y se forma un bucle D. En este punto se produce la decisión en el modelo de reparación hacia SBC o NSBC. Si el resultado final es NSBC la hebra invasora es expulsada y se produce síntesis de ADN tomando como molde la hebra hermana y ligando de nuevo las moléculas. Si la vía de reparación lleva hacia SBC, la invasión de hebra y el bucle D se estabilizan hacia la formación del intermediario de Holliday, en cuya estabilización está implicado el complejo MSH4/MSH5 y se incorporan las proteínas MLH1 y MLH3. Los puntos de corte asimétricos del doble intermediario de Holliday darán lugar a cromátidas recombinantes.

### 3.4. Interferencia y localización de quiasmas.

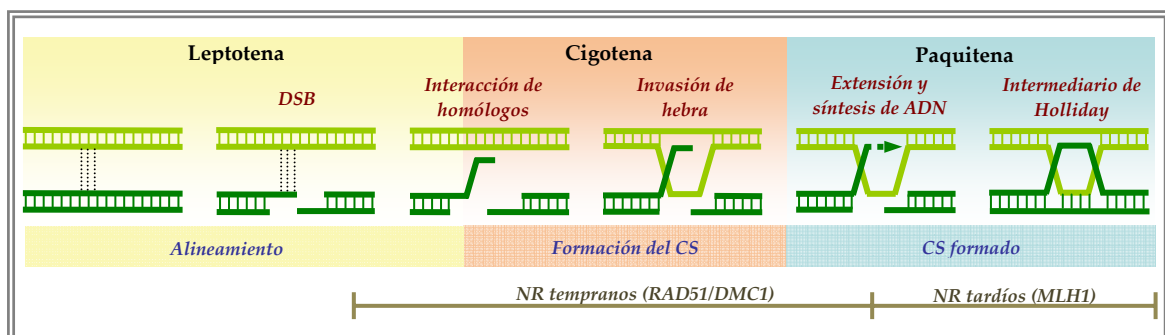
Cuando se establece un SBC, la probabilidad de que otro cercano ocurra disminuye. Este fenómeno se llama interferencia y contribuye sustancialmente a la distribución no al azar de los quiasmas (Borodin y col., 2008). El término localización de quiasmas hace referencia a que éstos ocurren preferencial o exclusivamente en determinadas regiones de los cromosomas. Ejemplos de localización de quiasmas los encontramos en saltamontes, donde los machos de la especie *S. grossum* presentan localización proximal en 8 de sus 11 bivalentes (Jones, 1971; Calvente y col., 2005) o en los machos de la especie *P. meridionales* los cuales muestran localización distal de los quiasmas (Viera y col., 2009b). También se han descrito casos en plantas, el centeno (*Secale cereale*) por ejemplo, presenta una localización distal de sus quiasmas (Orellana y Giráldez, 1981). La regulación de la localización de los SBC, posiblemente influenciada por los fenómenos de interferencia, parece no ocurrir siempre. Estudios en levaduras de la especie *S. cerevisiae* han descrito dos vías de recombinación que dan lugar a SBC como producto final, una de ellas depende del complejo MSH4-MSH5 y está sujeta a interferencia, la otra vía depende del complejo formado por MUS81 y EME1 y no parece implicar interferencia. Esta vía alternativa para dar lugar a SBC no se presenta en levaduras de fisión ni en otros eucariotas como *D. melanogaster*, pero sí parece estar activa en mamíferos (Sekelsky y col., 2000; McPherson y col., 2004; Cromie y Smith, 2007).

## 4. Relación entre la Recombinación y la Sinapsis.

Del análisis de la relación temporal existente entre la recombinación meiótica y la sinapsis se derivan dos modelos. Por un lado en *D. melanogaster* y *C. elegans* los procesos de inicio de la recombinación se retrasan hasta haber sido completada la sinapsis (Dernburg y col., 1998; McKim y Hayashi-Hagihara, 1998). Sin embargo, en *A. thaliana*, *M. musculus*, humanos y la gran mayoría de especies estudiadas hasta la fecha, la generación de “DSB” mediada por SPO11 es requisito previo e indispensable para la sinapsis (Ashley y col., 1995; Kleckner, 1996; Keeney y col., 1997; Mahadevaiah y col., 2001; Gerton y Hawley, 2005). En este segundo modelo aunque las “DSB” se producen en etapas donde no ha comenzado la sinapsis, la asociación final de homólogos, en lo

que serían los puntos de SBC en el momento de intermediario de Holliday, se resuelven en paquitena, etapa en que está completamente formado el CS (Fig. 5). Se ha sugerido un papel relevante en este proceso a algunos componentes de los FT (Heyting, 2005). Por lo tanto puede que el CS esté implicado en estabilizar al bivalente en el momento crucial de la formación de quiasmas, pudiendo ser el soporte de las proteínas implicadas en la resolución del mismo (Böner y col., 2004) y manteniendo la estructura cromosómica a pesar de todos los cambios moleculares que ocurren como consecuencia de los procesos de recombinación (Storlazzi y col., 2008). Uno de los ejemplos más evidentes de la estrecha relación entre la recombinación y los componentes del CS es el hecho de que los NR aparecen asociados a los EA/EL (Plug y col., 1998; Tarsounas y col., 1999). El segundo modelo es el más extendido, donde a pesar de que el inicio de la recombinación sea anterior a la sinapsis, las “DSB” se producen en etapas donde se han formado los EA, en leptotena, postulándose que las “DSB” son necesarias para el reconocimiento de homología previo a la sinapsis. En las especies que siguen esa secuencia, se ha descrito la disminución de muchas de las proteínas implicadas en señalización de las “DSB” y en las primeras etapas de la recombinación según avanza la sinapsis. Es el caso de la modificación en la histona H2AX para dar lugar a  $\gamma$ -H2AX en mamíferos. Estudios en ratón muestran que H2AX es fosforilada en leptotena y según las “DSB” son reparadas y progresa la sinapsis, la señal de  $\gamma$ -H2AX decrece gradualmente (Mahadevaiah y col., 2001). En mamíferos, focos de RAD51 aparecen en leptotena temprana, en cigotena se identifica su posición sobre los EA y EL del CS, en paquitena el número de focos de RAD51 desciende y en diplotena dejan de detectarse (Ashley y col., 1995; Plug y col., 1998). En *S. cerevisiae* se ha demostrado que complejos proteicos formados por RAD51/DMC1 no son sólo necesarios para la recombinación meiótica entre cromosomas homólogos, sino también para la sinapsis (Shinohara y col., 1992). En los mutantes tanto para RAD51 como para DMC1 se observan “DSB” sin reparar, reducido apareamiento entre homólogos así como escasa y retrasada sinapsis, en el caso de que exista (Rockmill y col., 1995; Pittman y col., 1998). No hay que olvidar que una de las funciones que se le atribuyen a estas recombinasas constituyentes de los NR tempranos, es la del reconocimiento de homología por invasión de hebra, lo que implica una relación directa entre los procesos de inicio de la recombinación y la asociación de cromosomas

homólogos. Pero los fallos en la sinapsis no sólo derivan de la ausencia parcial o total de alguna de estas proteínas de recombinación, tanto en ratón como en levaduras. Además, los mutantes de *mnd1-hop2* presentan defectos en el apareamiento entre homólogos y una alta tasa de sinapsis entre cromosomas no homólogos (Leu y col., 1998; Rabitsch y col., 2001; Petukhova y col., 2003). Estos ejemplos, sin olvidar la existencia de una correlación positiva entre la longitud del CS y la tasa de recombinación homóloga en diferentes organismos (Peterson y col., 1994; Quevedo y col., 1997; Kleckner y col., 2003), ponen de manifiesto la importancia del correcto funcionamiento de ambos procesos y la necesidad de una estricta coordinación.



**Figura 5. Interacciones entre cromosomas homólogos en las primeras etapas de la profase I, secuencia de la recombinación y la sinapsis.** En verde claro se esquematiza una cromátida y en verde oscuro su homóloga. Para simplificar sólo se ha dibujado una cromátida de cada cromosoma homólogo. Esquema adaptado de Page y Hawley, 2006.

## 5. La composición y conformación de la Cromatina.

La cromatina se compone de ADN, histonas y proteínas no histónicas. La unidad básica de la cromatina es el nucleosoma, el cual está compuesto por un octámero de histonas nucleosómicas (2 subunidades de H3, H4, H2A y H2B) rodeado por 146 pares de bases de ADN. Las histonas están sujetas a multitud de cambios postraduccionales, éstas modificaciones incluyen fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones y ubiquitinaciones, las cuales tienen una influencia directa en la estructura de la cromatina, contribuyendo al grado de accesibilidad de la misma, con consecuencias en importantes procesos biológicos (Margueron y col., 2005). Las modificaciones de histonas en el tiempo y en el espacio es lo que se ha denominado la teoría del *Código de Histonas* y postula que determinados cambios histónicos estarían relacionados con diferentes eventos celulares (Fischle y col., 2003; Ivanovska y Orr-Weaver, 2006).



Distintos patrones de modificaciones histónicas subyacen a determinadas regiones cromosómicas, incluyendo regiones de heterocromatina, de eucromatina, los centrómeros y los telómeros (Ivanovska y Orr-Weaver, 2006). La recombinación, la cohesión y la regulación de la expresión génica están influenciadas por la composición y conformación de la cromatina (Modesti y Kanaar, 2001; Holmquist y Ashley, 2006; Gartenberg, 2009).

Uno de los cambios en la cromatina relacionados directamente con la meiosis es la fosforilación de la histona H2A y sus variantes tras las “DSB” programadas (Downs y col., 2004; Madigan y col., 2002; Rogakou y col., 1998). Asimismo la desaparición de la variante fosforilada  $\gamma$ -H2AX, se relaciona en mamíferos con la progresión del CS (Mahadevaiah y col., 2001). De igual forma que procesos meióticos pueden influir en la cromatina, la cromatina puede influir en la meiosis. La proteína SPO11, responsable de las “DSB” de inicio de la recombinación, no actúa en cualquier punto de la cromatina, la conformación y composición de ésta parecen gobernar en muchos casos la preferencia por el lugar de corte (Petes, 2001; Kauppi y col., 2004). Recientemente se ha encontrado una relación entre la trimetilación de la histona H3 en su lisina 4 (H3K4me3) y la posición de las “DSB” (Borde y col., 2009). La idea que subyace a este ejemplo y a muchos otros es que determinadas modificaciones en la composición histónica de la cromatina, la especializa para funciones o momentos concretos (Wu y Lichten, 1994; Borde y col., 2000; Ivanovska y Orr-Weaver, 2006).

Los ejemplos de la influencia de determinadas modificaciones histónicas sobre la expresión génica son amplios. Tras la reparación de las “DSB”, la presencia de dimetilaciones en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me2) se ha relacionado con un silenciamiento transcripcional de cromosomas que no han sinapsado en la profase I de *C. elegans* (Maine y col., 2005). Niveles bajos de H3K4me3 se relacionan con reducidos niveles de expresión de genes meióticos relacionados con la reparación de “DSB” (Hayashi y col., 2005). Los lugares de anclaje del complejo de cohesina en levaduras corresponden con localizaciones de terminación transcripcional (Gullerova y Proudfoot, 2008) y se relacionan con sitios donde la ocupación de los nucleosomas sobre la molécula de ADN es reducida (Ivanovska y Orr-Weaver, 2006). En *D. melanogaster* la asociación de las cohesinas se relaciona con regiones transcripcionalmente activas

(Misulovin y col., 2008). Una modificación histónica que generalmente se relaciona con represión génica es la trimetilación en la lisina 9 o 27 de la H3 (H3K9me3 y H3K27me3). Ambas lisinas parecen estar metiladas por metiltransferasas específicas (HKMT: “*Histone Lysine Methyltransferasas*”). La metilación selectiva de H3K9 y H3K27 incluye a los cromosomas X inactivos de hembras de mamíferos, así como la regulación de determinados genes del desarrollo (Sims y col., 2003). En células humanas en interfase se ha observado un intenso marcaje del cromosoma X inactivo con H3K27me3 y una asociación de H3K9me3 con la heterocromatina centromérica (Zinner y col., 2006). Ambas modificaciones se muestran enriquecidas en los cromocentros en *D. melanogaster* y en general se relacionan con heterocromatina en mamíferos, aunque ambas marcan eucromatina en células somáticas en *A. thaliana* (Fuchs y col., 2006). De manera más concreta se suele relacionar, excepto en plantas, a H3K9me3 con heterocromatina constitutiva y a H3K27me3 con heterocromatina facultativa. La relación de la metilación de H3K9 con el silenciamiento génico y la heterocromatina se explica por su relación con la proteína HP1 (Proteína de la heterocromatina 1: “*Heterochromatin Protein 1*”). La HP1 y sus variantes son proteínas no histónicas asociadas a la cromatina y relacionadas con el modelo de compactación y organización de la heterocromatina (Eissenberg y Elgin, 2000). La interacción de HP1 con la cromatina depende del estado de metilación de H3 en K9, lo que explicaría la relación de metilaciones en H3K9 con la heterocromatina (Maison y Almouzni, 2004).

Una de las relaciones más interesantes es el enriquecimiento de las cohesinas en las regiones centroméricas. De esta forma se conoce que en *S. pombe* la proteína Swi6, ortóloga de HP1 de mamíferos, es necesaria para el enriquecimiento del complejo de cohesina en regiones heterocromáticas centroméricas y pericentroméricas (Nonaka y col., 2002). En células animales no está tan clara la relación entre la heterocromatina y el enriquecimiento de cohesinas en regiones centroméricas. Los ensayos de inmunofluorescencia muestran una mayor densidad de cohesinas en los centrómeros y se ha detectado una reducción de las cohesinas y ligeros defectos en la cohesión en células humanas mitóticas donde HP1 $\alpha$  está reducida, a la cual relacionan con una posible interacción con hSgo1 (Yamagishi y col., 2008). Esto contrasta con otros estudios donde no detectan reducción de hSgo1 en cromosomas mitóticos de células

carentes de HP1 y sugieren que la proteína HP1 no dirige el enriquecimiento de las cohesinas pericentroméricas (Serrano y col., 2009).

Todos estos ejemplos ponen en evidencia que la composición de la cromatina influye en procesos tan relevantes como la recombinación o la cohesión. A la cromatina deben asociarse multitud de complejos proteicos, como las cohesinas, las condensinas, las proteínas de recombinación o las que forman el CS. Por lo tanto, el diálogo entre conformación de la cromatina, su composición histónica y todas las proteínas que interaccionan con el ADN debe ser muy fluido.

## **6. Estructura del Cromosoma Meiótico.**

Todos los procesos que ocurren durante la meiosis tienen lugar sobre la base de la cromatina organizada para dar lugar al cromosoma. Durante el progreso de la primera división meiótica, los cambios locales ocurridos debido a los procesos de recombinación, se combinan con cambios globales en la estructura del cromosoma. El alineamiento de cromosomas homólogos, la condensación de la cromatina, el ensamblaje del CS y finalmente la constitución del bivalente tal y como lo observamos en metafase I son eventos en los que la organización del cromosoma tiene una gran influencia e importancia. Sin olvidar por supuesto a las cohesinas, las cuales están asociadas a la cromatina. Existen diversos modelos de estructura de la cromatina, el modelo que Paulson y Laemmli describieron en 1977 relativo a un *“scaffold” proteico y bucles radiales de la cromatina* sigue vigente en la actualidad para explicar la estructura cromosómica (Paulson y Laemmli, 1977). Los autores afirman que la fibra de 10nm formada por el ADN y los nucleosomas se pliega helicoidalmente sobre sí misma, dando lugar a la fibra de 30nm que sería la base para su posterior compactación. Esa fibra formaría bucles anclados de forma radial a un eje de proteínas no histónicas denominado *“scaffold”*. Finalmente, esta fibra así constituida se plegaría de nuevo sobre sí misma, excepto a nivel de las constricciones primarias y secundarias del cromosoma. El *“scaffold”* está compuesto por dos proteínas mayoritarias: la ADN Topoisomerasa II $\alpha$  y la SMC2, una subunidad del complejo de condensina (Earnshaw y col., 1985; Saitoh y Laemmli, 1994). De forma paralela al modelo del *“scaffold” y bucles radiales de la cromatina*, diferentes estudios realizados mediante tinción argéntica mostraron la existencia de unas

estructuras axiales localizadas en el centro de cada cromátida de cromosomas mitóticos de mamíferos (Howell y Hsu, 1979). A estas estructuras se les denominó ejes cromatídicos y posteriormente, mediante inmunolocalización de la proteína ADN Topoisomerasa II $\alpha$ , se comprobó que correspondían al “scaffold” cromosómico (Earnshaw y Laemmli, 1984). En cromosomas meióticos condensados de saltamontes se conoce la presencia de estructuras axiales, positivas a la tinción con plata, que recorren el cromosoma de telómero a telómero, identificándose con la posición del “scaffold” (Rufas y col., 1982). En este tipo de organismos, se propuso un modelo de organización de bucles radiales, siendo el “scaffold” cromosómico la estructura proteica sobre la que se ensamblarían algunas de las proteínas de los EA/EL del CS (Rufas y col., 1992). En este modelo se detalla que la posición relativa del “scaffold” y los bucles de cromatina varía desde la profase I hasta la transición metafase I – anafase I. Apareciendo primeramente los ejes en posición periférica o lateral respecto a las cromátidas de los cromosomas, para pasar a una posición central en la transición metafase I – anafase I (Rufas y col., 1987; Suja y col., 1991).

## **7. Los Saltamontes como Modelo de estudio.**

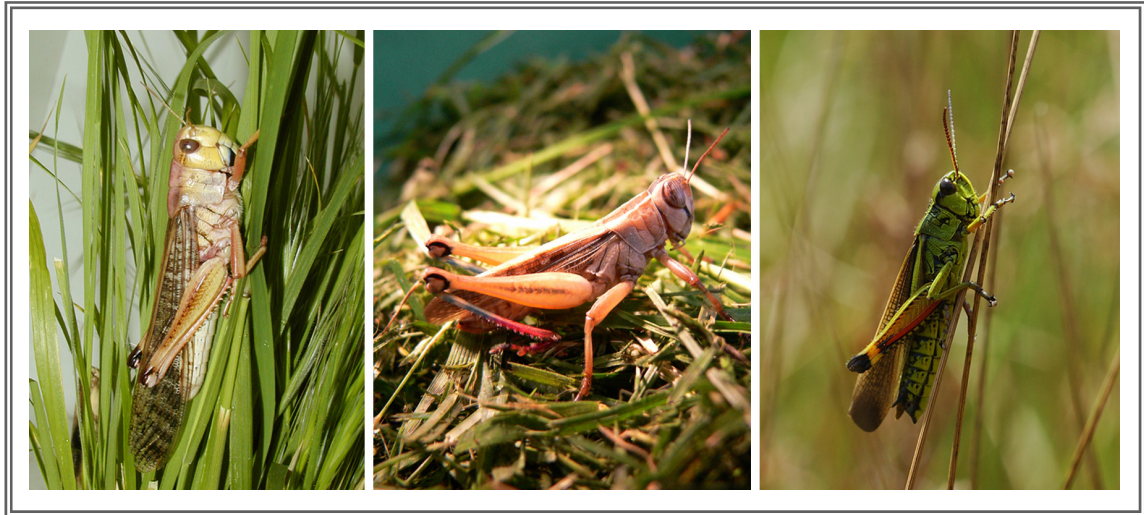
Los Ortópteros y en concreto los saltamontes, han sido un modelo clásico en estudios citogenéticos. El reducido número y considerable tamaño de sus cromosomas hacen que sean un sistema único. En 1965 M.J. White escribía sobre meiosis quiasmática y aquiasmática en una especie de saltamontes africanos (White, 1965). Poco más tarde, en 1969 Peter B. Moens publicó fotos tomadas al microscopio electrónico del CS de machos de la especie *Chortippus longicornis* (Moens, 1969) y ese mismo año se describían los efectos de la temperatura y los rayos X en la frecuencia de quiasmas en otra especie de saltamontes (Church y Wimber, 1969). Un poco más tarde G.H. Jones describió el sistema de los “complejos sinaptinémicos” modificados en machos de *Stethophyma grossum* (Jones, 1973; Jones, 1974; Jones y Wallace, 1980) y en 1977 Solari y Counce realizan un cariotipado mediante detección del CS sobre esparcidos de meiocitos de la especie *Melanoplus differentiales* (Solari y Counce, 1977). Dos años más tarde, Bernard John edita una serie de libros titulados “*Animal Cytogenetics*”, dentro de los cuales, el volumen 3, es un monográfico del orden *Orthoptera* escrito por Godfrey M. Hewitt

(Hewwitt, 1979). En los años 80 se publican diversos trabajos relativos a la organización cromosómica en mitosis y meiosis (Rufas y col., 1982; Rufas y col., 1987). El análisis de la estructura del cromosoma meiótico y mitótico y la organización de la cromatina es un tema donde los saltamontes han sido un modelo recurrente, sobre los cuales se han descrito por ejemplo, estructuras como el telocoro y se han aplicado técnicas como la tinción argéntica para la detección de los cinetocoros (Ray-Chaudhuri y Dutt, 1947; Henderson, 1971; Rufas y col., 1994; Suja y Rufas, 1994; Rebollo y Arana, 1995; del Cerro y col., 1996). En la década de los 90, estudios en *Eyprepocnemis plorans* analizaban la importancia de la cohesión para la orientación y segregación cromosómica (Suja y col., 1992). En la actualidad los estudios donde se utiliza alguna especie de saltamontes son muy variados, desde el análisis de cromosomas accesorios y su evolución (Granado y col., 2004; Abdelaziz y col., 2007), pasando por el estudio de variantes histónicas en meiosis (Cabrero y col., 2007; Loreto y col., 2008) y el análisis de los movimientos cromosómicos (Fabian y Forer, 2007), hasta el estudio de genes del desarrollo y diferenciación de la línea germinal con técnicas de ARN de interferencia (Dearden y Akam, 2001; Chang y col., 2002).

Todos estos análisis muestran la versatilidad de un sistema, donde el estudio de la meiosis puede realizarse desde muy diferentes puntos de vista y por tanto, podemos extraer una amplia visión del complicado proceso que lleva a la formación de gametos. Parte de esa versatilidad radica en los diferentes modelos cromosómicos que presentan este tipo de insectos. Para abordar los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral y que se detallarán más adelante, se van a utilizar saltamontes machos de tres especies diferentes: *Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* y *Stethophyma grossum* (Fig. 6). Todas estas especies tienen 22 autosomas y presentan un determinismo cromosómico del sexo del tipo XX en las hembras y X0 en los machos. El hecho de que el cromosoma sexual en los machos sea único permite estudiar el comportamiento meiótico de un cromosoma sin homólogo. Pero esta no es la única peculiaridad que encontramos entre estos Ortópteros. Algunos individuos de ciertas especies presentan en su cariotipo lo que se denominan cromosomas accesorios, supernumerarios o cromosomas B, los cuales son cromosomas adicionales, distintos a los del complemento A de la especie y dispensables. Estos cromosomas siguen su propia vía de evolución y comportamiento meiótico,

aunque se considera que algunos tipos de cromosomas B pueden derivar de cromosomas del complemento A (Camacho y col., 2000). El número de cromosomas B encontrados en un individuo es variable y su irregular comportamiento en meiosis y mitosis permite en algunos casos que se acumulen o que desaparezcan en las células resultantes tras un proceso de división celular, a menudo muestran una pauta similar a los cromosomas sexuales en cuanto a su tamaño, morfología y ciclo heteropicnótico de la cromatina en diferentes organismos (Amos y Dover, 1981; Jones y Rees, 1982; Jones, 1995). Esto sugiere que la evolución molecular de algunos cromosomas B pueda ser interpretada en el contexto de una evolución a partir de los cromosomas sexuales (Camacho y col., 2000). Una de las especies de saltamontes donde más ampliamente han sido estudiados los cromosomas accesorios es *E. plorans*. El sistema de cromosomas B encontrados en esta especie ha revelado diversos detalles de su evolución. Se conoce por ejemplo, que el único cromosoma del complemento A que comparte el orden de una secuencia de ADN satélite de 180bp y de AND ribosomal 18S-5.8S-28S con los cromosomas B1, B2, B5 y B24 de poblaciones mediterráneas, es el cromosoma X (Henriques-Gil y col., 1984; López-León y col., 1994; Cabrero y col., 2003). Los individuos de la especie *E. plorans* que hemos utilizado en este estudio presentan cromosomas B que presumiblemente son del tipo B1 o B24 porque son de la misma región geográfica que los descritos anteriormente. El estudio citogenético de la estructura de univalentes B y su comparativa con el cromosoma sexual en machos, permitirá tener una visión más amplia de las similitudes encontradas entre ambos tipos cromosómicos. Si a este hecho le añadimos además el análisis mediante anticuerpos específicos contra subunidades del complejo de cohesina o contra histonas modificadas, tal vez se pueda profundizar en el estudio de la evolución de los cromosomas B.

Los machos de las especies *E. plorans* y *L. migratoria* presentan sinapsis completa en todos sus autosomas y no se ha descrito ningún sistema especial de localización de quiasmas o de restricción de la recombinación. Estas características, que encajan en lo que sería un “comportamiento meiótico regular”, hace de estas dos especies nuestro modelo control para estudiar la dinámica de diferentes cohesinas y la relación temporal entre la recombinación y la sinapsis.



**Figura 6:** (De izquierda a derecha) Fotografía de un macho de *Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* y *Stethophyma grossum*. (No están a escala relativa una fotografía de otra).

De las tres especies que se incluyen en este análisis, las particularidades de los machos de la especie *S. grossum* los hace especialmente relevantes para el estudio de la meiosis. En los espermatoцитos de esta especie encontramos la coexistencia de tres situaciones sinápticas repartidas. Por un lado los tres bivalentes más cortos de su complemento (S10, S11 y M9) presentan sinapsis completa, entendida como sinapsis en toda la longitud del cromosoma; tal y como ocurre en los 11 bivalentes de las otras dos especies y en la gran mayoría de los organismos. Por otro lado, al igual que en *L. migratoria* y en *E. plorans*, los machos de *S. grossum* presentan el cromosoma sexual como univalente, permitiéndonos estudiar una situación de asinapsis. Por último, los ocho bivalentes más largos de su complemento (L1-M8) presentan sinapsis incompleta en los machos, formándose CS sólo en la región proximal (Shaw, 1970; Jones, 1973; Fletcher, 1977; Wallace y Jones, 1978; Jones y Wallace, 1980). Pero este no es el único detalle que hace a esta especie tan particular, además de la sinapsis incompleta encontramos que todos sus bivalentes, exceptuando el M9, presentan un único quiasma, que además se localiza en posición proximal en los 8 más largos (L1-M8) (Jones, 1971). El bivalente M9 ocasionalmente presenta dos quiasmas, haciendo que la frecuencia de quiasmas en los machos de la especie sea de 11.4 (Shaw, 1971). La posible relación entre una localización de quiasmas debido a un apareamiento parcial de los cromosomas en profase I, fue descrita por Fletcher en un artículo donde analizaba el sistema de los machos de la

especie *S. grossum* mediante microscopía electrónica y medición de la longitud de los CS observados (Fletcher, 1977).

En la era donde los estudios moleculares parecen de vital importancia para cualquier análisis, los saltamontes siguen siendo un modelo donde la citogenética tiene todavía mucho que decir. Basándonos principalmente en análisis mediante inmunolocalización de diferentes proteínas, en esta Tesis Doctoral se pretende abordar el estudio de la meiosis desde un punto de vista citogenético, haciendo hincapié en las relaciones de interdependencia existentes entre los procesos de recombinación, la sinapsis y el complejo de cohesina.







El objetivo principal de este trabajo es el estudio de las relaciones existentes entre el complejo de cohesina, la recombinación meiótica y la sinapsis en la meiosis de saltamontes machos adultos de las especies *Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* y *Stethophyma grossum*. Se ha desglosado este objetivo tan amplio en puntos más concretos:

1. Analizar la localización y distribución de diferentes subunidades del complejo de cohesina a lo largo de toda la meiosis en las tres especies de saltamontes.

2. Determinar la relación temporal existente entre la sinapsis y el inicio de la recombinación en especies con sinapsis completa como *Locusta migratoria* y *Eyprepocnemis plorans*.

3. Comparar la estructura cromosómica y localización de cohesinas y de proteínas de recombinación entre el cromosoma X y el B de machos de *Eyprepocnemis plorans*.

4. Determinar la relación temporal existente entre la sinapsis y la recombinación en los machos de *Stethophyma grossum*, una especie con sinapsis incompleta y localización de quiasmas.

5. Estudio de los efectos de la irradiación con rayos gamma sobre la recombinación, la sinapsis y la frecuencia y localización de quiasmas en espermatoцитos de *Stethophyma grossum*.

6. Estudiar la relación de las cohesinas y la estructura del cromosoma meiótico. Análisis de bivalentes con sinapsis completa, bivalentes con sinapsis incompleta y univalentes naturales (cromosoma X y B).



The main objective of this Thesis is to study the relationships among the cohesin complex, meiotic recombination and synapsis in grasshopper male meiosis of species *Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* and *Stethophyma grossum*. We have divided this broad objective in more specific items:

1. The analysis of location and distribution of different subunits of the cohesin complex during meiosis in these three grasshopper species.

2. Determine the timing between the synapsis progress and the beginning of recombination in grasshopper species with complete synapsis: *Locusta migratoria* and *Eyprepocnemis plorans*.

3. Comparison of the chromosomic structure and the location of proteins of the cohesin complex and proteins related to recombination process in the X and B chromosomes of males of *Eyprepocnemis plorans*.

4. Determine the timing and relationship between the synapsis progress and the recombination in a species with incomplete synapsis and quiasma localization, the males of *Stethophyma grossum*.

5. Study of the effects of gamma rays on recombination, synapsis and quiasma frequency and localization in *Stethophyma grossum* spermatocytes.

6. Analyze the relationship between the cohesin complex and the structure of the meiotic chromosome: study of bivalents with complete synapsis, bivalents with incomplete synapsis and natural univalents (X and B chromosomes).









## Material:

En este trabajo se utilizaron tres especies de saltamontes: *Locusta migratoria*, *Eyprepocnemis plorans* y *Stethophyma grossum*. La dotación cromosómica de las tres especies es de 22 autosomas, con un determinismo cromosómico sexual del tipo XO en machos y XX en hembras. Todos los cromosomas presentan el centrómero en posición terminal. Algunos individuos de las especie *E. plorans* presentan en su complemento cromosomas supernumerarios, también llamados cromosomas B.

Se emplearon testículos de machos adultos de poblaciones naturales y poblaciones criadas en cautividad. Parte de los individuos de *L. migratoria* utilizados se criaron en cautividad, en terrarios acondicionados (Fig. 7) con material vegetal para el aporte de líquido y comida, bajo condiciones ideales de temperatura de alrededor de 25°C y con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante todo el año. Otros sin embargo fueron adquiridos a la empresa holandesa Krecra ([www.kreca.com](http://www.kreca.com)) y a la empresa española Alcontán ([www.alcotanvalencia.com](http://www.alcotanvalencia.com)) las cuales suministran insectos vivos. Individuos machos adultos de *E. plorans* fueron capturados en las localidades españolas de San Juan (Alicante) y Torrox (Málaga) y se criaron en cautividad, bajo condiciones similares a las de *L. migratoria*, que permitieron su reproducción, obteniendo así una población estable en el laboratorio. Los individuos de la especie *S. grossum* se capturaron en los alrededores de la localidad de Orea, en Castilla la Mancha entre los meses de Julio y Septiembre de los años 2005, 2006, 2007 y 2009. Para las capturas se gestionaron los permisos correspondientes en cada provincia.



Figura 7: Terrario de cría de saltamontes.

## **Métodos:**

### **1. Fijación del material.**

#### **1.1. Etanol – acético.**

Mediante disección se extrae el testículo y se introduce en un tubo con fijador compuesto por tres partes de etanol puro (Merck) y una de ácido acético glacial (Merck). El material así fijado se conserva a -20°C hasta su utilización.

#### **1.2. Formaldehído – tritón.**

Este fijador se utiliza para técnicas de inmunolocalización de proteínas y está constituido por: formaldehído (Merck) al 2% en PBS 1X (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.7 mM, pH 7.4) con 0.1% de Tritón-X100 (Sigma).

#### **1.3. Paraformaldehído**

Este fijador se utiliza para la fijación de esparcidos de meiocitos. En un Erlenmeyer de vidrio con 90ml de agua destilada se añade 1g de paraformaldehído (Panreac) y 135µl de NaOH 5N. Se tapa el Erlenmeyer con “*parafilm*” (American National Can), el cual se perfora para permitir la salida de vapores y se introduce en un baño a 60°C hasta la completa dilución del paraformaldehído, agitándose de vez en cuando si fuese necesario. Tras enfriar la solución en agua corriente se añaden 3ml de tetraborato sódico (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O) 50mM diluido en agua destilada. Se agita y se ajusta el pH en un rango entre 9.2 – 9.5 con HCl 0.1N y NaOH 0.1N. Finalmente se añaden 150µl de Tritón-X100 (Sigma) y se ajusta el volumen con agua destilada hasta un volumen final de 100ml.

### **2. Obtención de meiocitos.**

#### **2.1 Aplastados.**

Para la obtención de aplastados de espermatoцитos se siguió el protocolo descrito previamente por el Dr. Jesús Page y la Dra. María Teresa Parra (Page y col., 1998; Parra y col., 2004b). Tras la disección de un saltamontes macho adulto, se extrae el testículo y se introduce durante 5 minutos en fijador de formaldehído-tritón o etanol-acético,

dependiendo del tratamiento posterior que se vaya a aplicar al material. Se colocan sobre un portaobjetos uno o dos túbulos seminíferos. Se disgregan ligeramente con unas pinzas y se coloca un cubreobjetos encima. Con ayuda de un papel de filtro se sujeta el cubreobjetos y se extiende el material con la punta de una aguja enmangada o un lápiz de mina blanda, 2B, con la punta afilada. De esta forma se extiende el material de forma homogénea. Acto seguido con ayuda de una almohadilla de papel de filtro, la cual se coloca sobre el cubreobjetos, se presiona el material con el dedo pulgar, asegurándose de hacer presión siempre sobre una superficie plana. Una vez extendido y aplastado el material, se introduce la preparación en nitrógeno líquido para su congelación y acto seguido se levanta el cubreobjetos con ayuda de una cuchilla, quedando el material fijado adherido al cristal del portaobjetos.

Para el almacenaje de preparaciones de aplastados de espermatocitos, tras la fijación en formaldehído-tritón, el protocolo descrito es igual hasta el punto donde se introduce la preparación en nitrógeno líquido. Tras ese paso, los portaobjetos deben colocarse en posición horizontal sobre nieve carbónica, lugar donde permanecen entre 5 y 10 minutos. Para almacenarlos se introducen en una caja de almacenamiento de portaobjetos, la cual debe estar a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  y se guarden a esa temperatura. Las preparaciones así almacenadas las denominamos "*ultrasquash*". Para poder utilizar una preparación guardada a  $-80^{\circ}\text{C}$  se introduce el portaobjetos, con el material fijado y aplastado y el cubreobjetos, en nitrógeno líquido y acto seguido se levanta el cubreobjetos, quedando el material adherido al cristal del portaobjetos.

Dependiendo de la tinción o técnica que se vaya a seguir, el material así preparado debe introducirse en PBS o bien dejar secar al aire. Del mismo modo, en función del material y la fijación el portaobjetos puede estar tratado previamente.

## **2.2 Esparcidos de espermatocitos fijados en paraformaldehído.**

Para la obtención de esparcidos de espermatocitos se utilizó la técnica previamente descrita por A.H. Peters (Peters y col., 1997) con ligeras modificaciones. Se extrae el testículo y se coloca en un pocillo con PBS 1X donde se elimina la grasa que rodea a los túbulos seminíferos. Con ayuda de unas pinzas y una cuchilla, esterilizadas previamente con etanol, se corta la parte proximal de los túbulos y se colocan en 200  $\mu\text{l}$

de una dilución de sacarosa 100mM en agua destilada. A continuación con ayuda de dos pinzas curvas dentadas se disgrega el material y se deja incubar la suspensión durante 15 minutos. Con anterioridad se ha preparado una cubeta de tinción con fijador de paraformaldehído donde se introducen portaobjetos, los cuales fueron previamente limpiados con metanol-acetona 1:1. Trascurridos los 15 minutos, se saca un portaobjetos de la cubeta, se limpia la parte de abajo con papel de filtro y se inclina para que el fijador se acumule en una esquina. Sobre esa esquina se añaden 15µl de la suspensión celular obtenida a partir de los folículos y se hace oscilar el portaobjetos con el fin de distribuir homogéneamente el material. De esta forma, el material es extendido y fijado simultáneamente. Se dejan secar los portaobjetos en horizontal en una cámara húmeda durante al menos 2 horas. Trascurrido ese tiempo se lavan los portaobjetos 3 veces con una dilución de Photo-Flo (Kodak) al 0.08% en agua destilada, dejando secar el material entre lavado y lavado y antes de realizar sobre ellos ninguna otra técnica o bien antes de ser almacenados a -80°C.

La técnica del aplastado mantiene el volumen celular, lo que permite conservar la organización del núcleo y la estructura cromosómica. De esta forma, tras la tinción con DAPI podemos inferir la etapa meiótica en la que se encuentra un espermatocito. Además con ésta metodología podemos tomar imágenes de diferentes planos focales hasta abarcar todo el volumen nuclear, permitiéndonos realizar reconstrucciones tridimensionales (Video 1 del material suplementario ofrecido en CD \*) y estudiar así la localización relativa de dos proteínas en el espacio (Video 2 del material suplementario ofrecido en CD). Esta metodología se revela especialmente útil en etapas de la meiosis donde ha desaparecido la envoltura nuclear, ya que al mantener la estructura cromosómica se conservan las proteínas en su posición y nos permite inferir detalles que con otras técnicas, como el esparcido, son de difícil comprobación. Por su parte, la técnica del esparcido tiene otras ventajas para el estudio de la meiosis, ya que permite tener a todos los elementos celulares en un único plano. Sin embargo, debido al choque hipotónico que es necesario aplicar al material, la cromatina pierde parte de sus propiedades, no pudiéndose distinguir unas etapas de otras tan sólo con la tinción con DAPI.

### 3. Anticuerpos.

A continuación se describen los distintos anticuerpos primarios y secundarios usados en el presente trabajo, todos ellos diluidos en PBS 1X hasta la concentración de uso correspondiente.

#### **3.1 Anticuerpos primarios.**

Para reconocer la subunidad de cohesina SMC3 se empleó un anticuerpo policlonal de conejo fabricado contra un péptido sintetizado a partir de una porción de la secuencia para SMC3 humana de la casa comercial “Chemicon International” (#AB3914) y un anticuerpo de conejo amablemente cedido por el Dr. José Luis Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) generado contra el extremo C-terminal (residuos del 1028 al 1217) de la secuencia de la proteína humana (Prieto y col., 2004). Es importante destacar que en el caso del anticuerpo contra la proteína SMC3 de “Chemicon International” tan sólo funcionó en saltamontes el lote número 220701985. Ambos anticuerpos contra la proteína SMC3 fueron utilizados a una dilución 1:30 en *Locusta migratoria* y *Eyprepocnemis plorans*, sin embargo en *Stethophyma grossum* el anticuerpo de “Chemicon International” se usó a 1:30 pero el anticuerpo cedido por el Dr. José Luis Barbero fue utilizado a 1:200.

La subunidad del complejo de cohesina SMC1 $\alpha$  fue reconocida mediante un anticuerpo policlonal amablemente cedido por el Dr. José Luis Barbero. Dicho anticuerpo fue realizado en conejo contra un péptido sintético obtenido a partir del extremo C-terminal (residuos del 1047 al 1233) de la secuencia humana para dicha proteína (Krasikova y col., 2005). La dilución de uso en *L. migratoria* y *E. plorans* fue de 1:30 en PBS 1X, sin embargo al igual que con el anticuerpo anterior, en *S. grossum* se utilizó a 1:200.

Se realizaron distintas pruebas para intentar reconocer la cohesina SMC1 $\beta$  mediante un anticuerpo comercial policlonal anti-cabra de Santa Cruz Biotechnology. Se hicieron pruebas cambiando las condiciones de fijación, aumentando el porcentaje de Tritón-X100 (Sigma) y probando a diluir el anticuerpo 1:50, 1:30 y 1:10 en PBS. En todos los casos el resultado fue negativo.

La cohesina RAD21 fue detectada a partir de un anticuerpo anti-DRAD21 de conejo generado contra el extremo carboxilo de la secuencia de la proteína de *Drosophila melanogaster* cedido por la Dra. Margarete M.S. Heck de la Universidad de Edimburgo (Reino Unido) (Vass y col., 2003; Valdeolmillos y col., 2004). La dilución de uso es 1:30.

La subunidad de cohesina SA1 se localizó mediante un anticuerpo anti-DSA1 generado contra una proteína recombinante de la secuencia de *D. melanogaster* generado y cedido por la Dra. Ana Valdeolmillos (Valdeolmillos y col., 2004).

Se realizaron diversas pruebas para intentar detectar en inmunofluorescencia la proteína SYCP3. Concretamente se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo cedido por el Dr. José Ángel Suja, el cual fue probado bajo diferentes condiciones de fijación y diluido a 1:50, 1:30 y 1:10 con resultados negativos. De igual forma se probó un anticuerpo monoclonal de ratón de Santa Cruz Biotechnology contra la SYCP3 murina denominado SCP-3 (D-1): sc-74569. Tal y como en el caso anterior los resultados de las diferentes pruebas realizadas con este anticuerpo resultaron negativas.

Para detectar la presencia de roturas de doble hebra en el ADN, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón (Upstate Biotechnology) que reconoce los aminoácidos 134 -142 de la variante histónica humana  $\gamma$ -H2AX, la cual está fosforilada en la serina 139 (Paull y col. 2000), a una concentración 1:500. La secuencia reconocida por éste anticuerpo es de ocho aminoácidos en levaduras y ratón (Redon y col. 2002).

Un anticuerpo policlonal de conejo anti-RAD51 (ab-1; PC130; Calbiochem) a una concentración 1:30, generado contra la proteína HsRAD51, fue usado para detectar la recombinasa RAD51.

Para reconocer epítomos fosforilados de fosfoproteínas que incluyen MAP2, HSP70, cdc25 y la ADN Topoisomerasa II $\alpha$ , se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-MPM2 (Mitotic Protein Monoclonal; 05-368; Upstate Biotechnology) a una dilución de 1:1000.

La Topoisomerasa II $\alpha$  se reconoció mediante un anticuerpo monoclonal de ratón, generado en células híbridas de ratón (clon Ki-S1) contra la proteína humana, de Chemicon Internacional. En este caso se utilizó puro (1:1).

La inmunodetección de la histona H3 trimetilada en su lisina 9 (H3K9me3), se realizó mediante un anticuerpo policlonal de conejo (Sigma), realizado contra dicha

modificación a partir de la secuencia humana. El anticuerpo contra H3K9me3 se utilizó a una dilución 1:100 en PBS.

Además de estos anticuerpos comerciales o cedidos, se encargó a GenScript Corporation ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)) la elaboración de anticuerpos contra las subunidades del complejo de cohesina SMC1 $\alpha$ , RAD21 y SA1. Para la elaboración de los anticuerpos se buscó en la base de datos [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) la secuencia de la subunidad del complejo de cohesina SMC1 $\alpha$  perteneciente a humanos y las secuencias de las subunidades del complejo de cohesina RAD21 y SA1 de la especie *Drosophila melanogaster*. Mediante varias consultas al servicio técnico de la compañía se seleccionó en cada uno de los casos el péptido aparentemente más inmunorreactivo para cada una de las proteínas y se encargó la inoculación de dos conejos por cada uno de ellos. La secuencia utilizada para la elaboración del péptido en el caso de SMC1 $\alpha$  fue: CLTKYPDANPNPNEQ. Para la subunidad del complejo de cohesina SA1 se realizó un péptido sintético de secuencia: GPTERKERVERPRKC. Por último, en el caso de la generación de anticuerpos contra RAD21 se utilizó el siguiente péptido sintético: KGRKRKNDNMSNLFC. El resultado final fue la obtención de 2 anticuerpos policlonales resultantes de la 3ª inmunización, cada uno de ellos generado en un conejo distinto, contra cada una de las subunidades del complejo de cohesina mencionadas, más 2 anticuerpos policlonales resultantes de la 4ª inmunización, cada uno de ellos generado en un conejo distinto, contra cada una de las subunidades del complejo de cohesina mencionadas, además de un suero pre-inmune por conejo inoculado. En ningún caso se obtuvieron resultados positivos en las pruebas de inmunofluorescencia realizadas con éstos anticuerpos.

En la tabla 2 se describen los anticuerpos comerciales o cedidos analizados en esta memoria. En la tabla 3 se describen los anticuerpos encargados a GenScript Corporation.

Tabla 2: Anticuerpos primarios comerciales o cedidos.

Anticuerpo primario	Dilución de uso		Procedencia del anticuerpo	Tipo	Procedencia de la secuencia
SMC3 Ch.	1:30		Chemicon International	Policlonal de conejo	Humana
SMC3 k987	<i>E. plorans</i> <i>L. migratoria</i>	1:30	Generado por el Dr. José Luis Barbero (Prieto y col., 2004)	Policlonal de conejo	Humana
	<i>S. grossum</i>	1:200			
SMC1 $\alpha$ k988	<i>E. plorans</i> <i>L. migratoria</i>	1:30	Generado por el Dr. José Luis Barbero (Krasikova y col., 2005)	Policlonal de conejo	Humana
	<i>S. grossum</i>	1:200			
SMC1 $\beta$	1:10 / 1:30 / 1:50		Santa Cruz Biotechnology	Policlonal de cabra	Humana
RAD21 737	1:30		Cedido por la Dra. Margarette M.S. Heck (Vass y col., 2003)	Policlonal de conejo	<i>D. melanogaster</i>
SA1 k277p	1:30		Generado por la Dra. Ana Valdeolmillos (Valdeolmillos y col., 2004)	Policlonal de conejo	<i>D. melanogaster</i>
SYCP3	1:10 / 1:30 / 1:50		Generado por el Dr. José Ángel Suja	Policlonal de conejo	Ratón
	1:10 / 1:30 / 1:50		Santa Cruz Biotechnology	Policlonal de ratón	Ratón
$\gamma$ -H2AX	1:500		Upstate Biotechnology	Policlonal de conejo	Humana
RAD51	1:30		Calbiochem	Policlonal de conejo	Humana
MPM2	1:1000		Upstate Biotechnology	Monoclonal de conejo	-
Topoisomerasa II $\alpha$ (Ki-S1)	1:1		Chemicon international	Monoclonal de ratón	Humana
H3K9me3	1:100		Abcam	Policlonal de conejo	Humana



Tabla 3: Anticuerpos primarios encargados.

Anticuerpo primario	Secuencia antigénica (péptido sintético)	Tipo	Inmunización	Procedencia de la secuencia
SMC1 $\alpha$ (1220) 3 <sup>o</sup> Imn. A	CLTKYPDANPNPNEQ	Policlonal de conejo A	3 <sup>a</sup>	Humana
SMC1 $\alpha$ (1220) 3 <sup>o</sup> Imn. B		Policlonal de conejo B		
SMC1 $\alpha$ (1220) RIP. A		Policlonal de conejo A	4 <sup>a</sup>	
SMC1 $\alpha$ (1220) RIP. B		Policlonal de conejo B		
SA1 (80) 3 <sup>o</sup> Imn. A	GPTEKERVERPRKC	Policlonal de conejo A	3 <sup>a</sup>	<i>Drosophila melanogaster</i>
SA1 (80) 3 <sup>o</sup> Imn. B		Policlonal de conejo B		
SA1 (80) RIP. A		Policlonal de conejo A	4 <sup>a</sup>	
SA1 (80) RIP. B		Policlonal de conejo B		
RAD21 (442) 3 <sup>a</sup> Imn. A	KGRKRKNDNMSNLFC	Policlonal de conejo A	3 <sup>a</sup>	<i>Drosophila melanogaster</i>
RAD21 (442) 3 <sup>a</sup> Imn. B		Policlonal de conejo B		
RAD21 (442) RIP. A		Policlonal de conejo A	4 <sup>a</sup>	
RAD21 (442) RIP. B		Policlonal de conejo B		

### 3.2. Anticuerpos secundarios.

Para detectar los anticuerpos primarios obtenidos en conejo se utilizaron los secundarios generados en cabra anti-conejo IgG acomplejado con isocianato de fluoresceína (FITC) o con Texas Red (TR) (Jackson), a una dilución 1:150 en PBS. Aquellos anticuerpos primarios que se obtuvieron en ratón fueron detectados con: cabra anti-ratón IgG acomplejado con FITC o con TR (Jackson). Los anticuerpos primarios generados en cabra fueron revelados mediante los anticuerpos secundarios de burro Alexa Fluor 488 anti-cabra IgG (Invitrogen). En las inmunodetecciones dobles, donde ambos anticuerpos primarios fueron generados en la misma especie, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra acomplejado con FITC frente a la región Fab de la IgG de la especie correspondiente (Jackson) a una dilución de 1:100 en PBS, para la detección del primer anticuerpo primario. Para la detección del segundo anticuerpo primario se utilizó un secundario de cabra acomplejado a TR similar al de las inmunodetecciones simples a una dilución 1:150.

## **4. Extractos de proteínas.**

### **4.1. Extracto de proteínas de testículo de saltamontes.**

Se realizaron extractos de proteína total de testículo de las tres especies de saltamontes utilizadas en el estudio, para lo cual se extrajeron los testículos y se limpiaron los túmulos seminíferos de grasa en un pocillo con PBS 1X. Una vez completamente limpio, el testículo se introduce en un homogeneizador ("*potter*") en hielo y se añade 1ml de tampón de solubilización SDS.

#### **Tampón de solubilización SDS:**

Tris-HCl pH 6.8 a una concentración final de 50 mM  
EDTA a una concentración final de 5 mM  
5% de SDS  
1% de inhibidor de proteasas (Sigma P-8340)

Se tritura el material y se coloca en un bote "*eppendorf*" que se introduce en un vaso de precipitados con agua hirviendo durante 5 minutos (se debe tener la precaución de agujerear el tapón del "*eppendorf*" para que no estalle). Acto seguido el material se congela a -80°C hasta su utilización.

### **4.2. Extracto de proteínas de testículo de ratón.**

Tras sacrificar al ratón en una cámara de CO<sub>2</sub> se extrajo el testículo y se eliminó la túnica albugínea (el material se puede utilizar fresco o congelar a -80°C introduciéndolo primero en nitrógeno líquido). Se depositó el material en un homogeneizador ("*potter*") sobre hielo con 1ml de solución de solubilización SDS cuya composición varía ligeramente a la utilizada en saltamontes, de esta forma en vez de un porcentaje final de SDS del 5%, en ratón debe ser del 3%. Se homogeniza el material, se hierve durante 5 minutos y se congela a -80°C hasta su utilización.

### **4.3. Extracto de proteínas de cultivos celulares.**

Se obtuvo extracto de proteína total de una muestra humana mediante la siembra y recogida de células HeLa en cultivo (amablemente cedidas por el doctorando D. José Manuel Pérez del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid). También se utilizaron células S2 de *Drosophila melanogaster* (amablemente

cedidas por la Dra. Ana Valedolmillos). Ambos tipos celulares se lavaron en PBS 1X y tras una centrifugación a 1500 r.p.m. se eliminó el sobrenadante y se lisaron en hielo con un tampón de solubilización similar al utilizado en ratón. El material así homogenizado se incubó durante 20 minutos en el tampón, tras lo cual se hirvió 5 minutos y se conservó a -80°C.

## 5. Electroforesis en geles de poliacrilamida y “Western Blott”.

Se prepararon los geles de poliacrilamida al porcentaje necesario según Laemmli (Laemmli, 1970) y se cargan rápidamente entre los cristales de la cubeta de electroforesis para que su polimerización sea homogénea. Se añade un poco de agua destilada y se deja solidificar. Una vez polimerizado, se elimina el agua, se prepara el gel de “stack” según los protocolos establecidos y se añade sobre el gel de poliacrilamida donde van a correr las proteínas. Con cuidado de no hacer burbujas se coloca el peine para formar los pocillos de carga y se deja polimerizar. Se rellena la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis 1X.

**Tampón de electroforesis** (25mM hidroximetil-aminometano, 192mM Glicina, 0.1% SDS):

3g de Tris-HCl  
14.4g de Glicina  
1g de SDS  
Agua destilada hasta 1l  
Ajustar a un pH final de 8.3

Una vez polimerizado el gel, se retira el peine y se procede a llenar los pocillos con los extractos de proteínas, así como los marcadores de peso molecular (Bio-Rad, amplio rango 161-0318; Bio-Rad estándar preteñido 161-0324). Antes de cargar los pocillos, los extractos deben ser hervidos 5 minutos con solución de electroforesis 5X (5µl de solución por cada 10µl de extracto). Por cada pocillo se utiliza un volumen final de extracto más solución de electroforesis de 20µl.

**Solución de electroforesis 5X** (Solución de electroforesis 1X: Tris-HCl 62.2mM, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0.005%):

2g de SDS  
5ml de β-mercaptoetanol  
11.5ml de Glicerol al 87%  
5mg de azul de bromofenol  
3.12ml de Tris-HCl 2M, pH 7.0  
Agua destilada hasta 20ml

Se coloca la cubeta en la fuente (Bio-Rad, modelo 1000/500) y se deja correr el tiempo necesario hasta que se observen los marcadores moleculares a la altura requerida, a un voltaje de entre 120 y 140V. Antes de realizar la transferencia se empapan los geles, los papeles 3MM (Bio-Rad 153880) y las esponjas en tampón de transferencia 1X durante 15 minutos. Se monta el set de transferencia poniendo las esponjas en los extremos, sobre ellas los papeles 3MM y hacia el lado negro de la placa de transferencia, el gel. Sobre el gel se coloca la membrana de transferencia con la precaución de que no queden burbujas (Bio-Rad Trans-Blot Tranfer Médium, 162-0115).

**Tampón de transferencia** (Tris-HCl 25mM pH8.3, Glicina 192mM, SDS 0.01%)

30g/l de Trizma-base (Sigma)

144g/l de Glicina

1g/l de SDS

Se prepara 10X y se diluye añadiendo un 20% de metanol.

Se coloca el set de transferencia en la cubeta y se rellena con tampón 1X, realizándose la transferencia sobre un recipiente con hielo a 310mA durante 1 hora y media. Trascurrido este tiempo el protocolo cambia dependiendo del anticuerpo utilizado. Así, para detectar las cohesina SMC3 con el anticuerpo de Chemicon International, la cohesina RAD21 con el anticuerpo cedido por la Dra. Margarette M.S. Heck y la cohesina SA1 con el anticuerpo cedido por la Dra. Ana Valdeolmillos, se lavan las membranas en agitación con PBS 1X/Tween20 0.005% durante 10 minutos y posteriormente con PBS1X durante otros 10 minutos. Acto seguido se incuban en una dilución bloqueante de PBS 1X más 4% de leche desnatada en polvo (Nestlé Sveltesse) durante 20 minutos. Posteriormente se incuban en una dilución 1:3000 de anticuerpo primario diluido en la misma solución bloqueante durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación se lavan las membranas 5 minutos con PBS 1X, otros 5 minutos con PBS 1X/Tween 20 0.005% y por último 10 minutos con PBS 1X. Después de los lavados se incuban las membranas durante 45 minutos en un anticuerpo secundario de burro que reconoce IgGs de conejo unido a peroxidasa (Amersham) a una concentración 1:5000 en PBS 1X, tras lo cual se lavan 3 veces de 10 minutos en PBS 1x/Tween20 0.005% y finalmente 10 minutos en PBS. Para detectar las cohesinas SMC3 con el anticuerpo K987 y la SMC1 $\alpha$  con al anticuerpo K988 cedidos por el Dr. José Luis Barbero, tras la transferencia se lavan brevemente las membranas con 1X/Tween20 1% y se incuban en

una solución bloqueante de PBS 1X/Tween20 1% con 10% de leche desnatada en polvo Nestlé Sveltesse y 5% de BSA durante una hora. Trascurrido ese tiempo se lavan 3 veces durante 10 minutos en PBS 1X/Tween20 1% y se añade el anticuerpo primario a una dilución 1:1000 en PBS 1X/Tween20 1% y 5% de leche desnatada en polvo. Se deja incubar el anticuerpo primario toda la noche a 4 °C y tras 4 lavados de 10 minutos en PBS 1X/Tween20 1% se incuba durante una hora con un secundario de burro que reconoce IgGs de conejo unido a peroxidasa (Amersham) a una concentración 1:5000 diluido en PBS 1X/Tween 20 1%. Finalmente se lavan las membranas 3 veces de 10 minutos con PBS 1X/Tween 20 1%. Para intentar detectar mediante “*western blott*” la subunidad SMC1 $\beta$ , se realizaron ambos protocolos diluyendo el anticuerpo primario a 1:1000 y utilizando un anticuerpo secundario anti-cabra conjugado con peroxidasa de Jackson laboratorios.

Posteriormente, se procede al revelado del anticuerpo secundario con un sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Amersham, RPN 2106 Batch109) según las instrucciones de fabricante. Posteriormente se coloca la membrana entre dos plásticos lisos y transparentes para evitar que se moje la película radiográfica (Kodak X-OMAT UV) y ésta se coloca encima del plástico, exponiéndose en oscuridad un tiempo entre 1 y 10 minutos. Posteriormente la película se revela con el revelador de papel autoradiográfico (Kodak-LX24) a temperatura ambiente y durante menos de un minuto.

## **6. Immunoprecipitación.**

Sobre 70 $\mu$ l de extracto de proteínas de testículo de saltamontes, procesado tal y como se explica en el punto 4.1, se añaden 2 $\mu$ l del anticuerpo contra la proteína que queramos precipitar. Se incuba toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente se añaden 40 $\mu$ l de proteína A (Invitrogen) y se incuba durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Trascurrido ese tiempo se centrifuga durante 2 minutos a 2000rpm, quedando un sobrenadante y un pellet. Se extrae el sobrenadante (sobrenadante 1) y se guarda a temperatura ambiente, será el control para comprobar que la precipitación ha sido adecuada. Al pellet se le añade 1ml de buffer B y se resuspende.

**Buffer B** (Se calcula para un volumen total de 10ml en agua destilada)

100µl de un cóctel de inhibidores (Complete mini, EDTA free. Roche)  
200µl HEPES 1M (Sigma)  
2ml Glicerol (Sigma)  
0.333ml KCl 3M  
20µl MgCl<sub>2</sub> 1M  
4µl EDTA 0.5M

Acto seguido se centrifuga durante 2 minutos a 2000rpm, tras lo cual se retira el sobrenadante y se repite el lavado con buffer B tres veces más. Guardamos cada uno de los sobrenadantes resultantes de los lavados (sobrenadante 2, 3, 4 y 5). A continuación, sobre el último pellet se añade 30µl de buffer B y 10µl de buffer de carga (solución de electroforesis 5X igual a la del protocolo de “*Western Blott*” del apartado 5). Se resuspende suavemente y se calienta a 91°C durante 7 minutos. Por otro lado, al sobrenadante 1 se le añaden 5µl de buffer de carga (solución de electroforesis 5X igual a la del protocolo de “*Western Blott*” del apartado 5) por cada 10µl de sobrenadante y se calienta igualmente a 91°C durante 7 minutos. A partir de este punto el protocolo es igual al del apartado 5 (Electroforesis en geles de poliacrilamida y “*Western Blott*”). Se preparan geles de poliacrilamida y se cargan los pocillos. En un carril se añade el sobrenadante 1, en otro carril se carga el pellet resultante de los lavados con buffer B y en otro carril el marcador de peso molecular (Bio-Rad). Una vez se corre el gel y se realiza la transferencia a la membrana, se realiza la inmunodetección sobre la membrana con los anticuerpos contra las proteínas que consideremos pueden estar formando un complejo proteico con aquella que fue inmunoprecipitada al principio. Concretamente en esta memoria de Tesis Doctoral hemos realizado la inmunoprecipitación de los anticuerpos: RAD21 737 cedido por la Dra. Margarette M.S. Heck, SMC1α K988 y SMC3 K987 cedidos por el Dr. José Luis Barbero. Una vez se ha realizada la electroforesis y la transferencia, se han incubado cada una de las membranas resultantes de cada inmunoprecipitación, con los anticuerpos: RAD21 737 cedido por la Dra. Margarette M.S. Heck, SMC1α K988 y SMC3 K987 cedidos por el Dr. José Luis Barbero.

## ***7. Tratamiento de irradiación con Rayos Gamma.***

Machos adultos de la especie *S. grossum* fueron irradiados con rayos gamma a diferentes dosis: 1Gy, 2.5Gy, 5Gy y 10Gy. Se trataron entre 5 y 15 individuos para cada

dosis. La dosis por minuto aplicada por el irradiador fue de 2.99 Gy/minuto. Tras diferentes periodos de recuperación de 1 hora y de entre 1 y 12 días se extrajo el testículo y se procesó para su posterior análisis.

## **8. Tinciones.**

### **8.1. Tinción argéntica sobre aplastados.**

Se utilizan testículos fijados en etanol-acético. Para ésta tinción no es necesario tratar previamente los portaobjetos. Se seleccionan uno o dos folículos, se colocan sobre un portaobjetos, se añade una gota de ácido acético al 50% en agua destilada y se aplastan con un cubreobjetos siguiendo la técnica descrita en el apartado 2.1. El material así fijado y extendido se congela sumergiéndolo en nitrógeno líquido y acto seguido se levanta el cubreobjetos con ayuda de una cuchilla. Las muestras se dejan secar a temperatura ambiente. Una vez secas, se incuban durante 15 minutos en 2XSSC (Solución Salina Citrada: NaCl 0.3M, citrato sódico  $\text{NaH}_2(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$  0.03M) a en un baño a 60°C y posteriormente se lavan bajo el grifo abundantemente, dejándolas secar de nuevo a temperatura ambiente. Sobre cada preparación se pone una gota de dilución de nitrato de plata: 0,1g de  $\text{AgNO}_3$  en 100µl de agua acidulada (100µl de ácido fórmico en 200ml de agua destilada). Rápidamente se cubre con un cubreobjetos y se incuba 3 minutos en una estufa a una temperatura de 80°C. El grado de tinción se controla bajo microscopía óptica de campo claro y una vez adquirido el color adecuado se elimina el cubreobjetos con agua del grifo, se dejan secar al aire y finalmente se montan en definitivo con Eukitt (O. Kindler GmbH).

### **8.2. Tinción con orceína acética.**

El material debe estar fijado previamente en etanol-acético. En un pocillo con orceína acética (1:9 de HCl 1N y solución de orceína: 2% orceína y 55% de ácido acético glacial en agua destilada) se colocan varios túbulos seminíferos y se dejan por un periodo no inferior a una hora. Transcurrido el tiempo necesario, dos o tres túbulos se colocan sobre un portaobjetos y se añade una gota de ácido acético glacial al 50% en agua destilada. Se espera unos segundos hasta la liberación del exceso de tinte, se coloca un cubreobjetos sobre el material y se aplasta según la técnica descrita previamente

(apartado 2.1). Las preparaciones se observan directamente con un microscopio óptico y tras comprobar el estado del material se congelan en nitrógeno líquido, se levantan los cubreobjetos con ayuda de una cuchilla y se dejan secar a temperatura ambiente en vertical. Una vez seca se monta en definitivo con Eukitt. Los portaobjetos utilizados no necesitan ningún tratamiento previo.

**Preparación de la orceína acética:**

Para un volumen de 100ml, se disuelven 2g de orceína (Gurr) en 55ml de ácido acético glacial (Merck). Se calienta hasta ebullición y se mantiene 10 minutos. Se deja enfriar y se completa el volumen hasta 100ml con agua destilada. Se deja reposar 12h y se filtra.

Para la solución de trabajo se añade en 1 parte de HCl 1N por cada 9 partes de la solución de orceína anterior.

## ***9. Inmunofluorescencia.***

### **9.1. Preparación del material.**

Para realizarla sobre aplastados los portaobjetos deben ser limpiados previamente con metanol-acetona 1:1 y recubiertos con poli-L-Lisina 1mg/ml (Sigma, P-8920). Se extrae el testículo y se fija en formaldehído-tritón colocándolo en un pocillo, donde se elimina la grasa que recubre a los túbulos seminíferos con ayuda de unas pinzas. Se aplasta el material y se congela en nitrógeno líquido (apartado 2.1). Una vez congelado y levantado el cubreobjetos, se introduce el portaobjetos rápidamente en una cubeta de tinción con PBS 1X. Si por el contrario la inmunofluorescencia se realiza sobre esparcidos (apartado 2.2), éstos debe ser prehidratados en PBS 1X durante 5 minutos antes de realizar la inmunodetección.

### **9.2. Protocolo.**

Una vez listas las preparaciones, bien por la técnica de aplastado (apartado 2.1.) o bien mediante esparcido (apartado 2.2), se lavan 3 veces 5 minutos en PBS 1X. Se preparan 30µl por aplastado o bien 50µl por esparcido en PBS 1X de la dilución de uso del anticuerpo primario que se vaya a utilizar y se depositan sobre el material. Acto seguido se coloca un cubreobjetos y se incuba en cámara húmeda durante 45 minutos a temperatura ambiente o bien durante varias horas (entre 12 y 20 horas) a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación se retiran los cubreobjetos por inmersión en PBS 1X



y se lavan las preparaciones 3 veces, durante 5 minutos cada lavado, en PBS 1X. Se preparan alícuotas en PBS 1X de 30µl para los aplastados y de 50µl para los esparcidos de los anticuerpos secundarios correspondientes y se depositan sobre el material, cubriéndolo posteriormente con un cubreobjetos. Trascurrido un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y en oscuridad se retiran los cubreobjetos por inmersión en PBS 1X y se lavan las preparaciones 3 veces durante 5 minutos en PBS 1X.

Las inmunodetecciones dobles de dos proteínas se realizan incubando de forma simultánea dos anticuerpos primarios. El revelado con los anticuerpos secundarios correspondientes también se realiza de forma simultánea, pero teniendo la precaución de añadir uno de los secundarios acompañado con isocianato de fluoresceína (FITC) y otro a Texas Red (Jackson). En aquellos casos en los que ambos anticuerpos primarios fueron generados en el mismo animal, se realiza la inmunodetección de forma secuencial. De esta forma se incuban las preparaciones con uno de los anticuerpos primarios durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, tras lo cual la preparación se lava 3 veces en PBS 1X durante 5 minutos. Estas mismas preparaciones se incuban toda la noche a 4°C en cámara húmeda con el anticuerpo secundario correspondiente a la especie donde se generó el primario, pero acompañado con isocianato de fluoresceína (FITC) frente a la región Fab' de las IgGs (Jackson). Al día siguiente se elimina el cubreobjetos por inmersión en PBS 1X y se lavan las muestras 6 veces durante 5 minutos en PBS 1X. Acto seguido se incuban con el otro anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda y tras 3 lavados en PBS 1X de 5 minutos se incuban con el anticuerpo secundario correspondiente a la especie donde se generó el primario, pero ésta vez acompañado a Texas Red (Jackson).

Una vez realizada la inmunodetección se tiñe la cromatina con el intercalante de ADN DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1µg/ml durante 3 minutos. Tras un último lavado en agua destilada para retirar el cubre-objetos se montan las preparaciones usando Vectashield (Vector Laboratorios) y se sellan con esmalte de uñas.

## ***10. Observación de las muestras: captura y procesamiento de imágenes.***

Las preparaciones fueron observadas usando un microscopio Olympus BX61 equipado con óptica epifluorescente y motorizado en el eje Z. Las imágenes se capturaron con cámaras digitales Olympus DP70, DP71 y DP80 usando el software AnalySIS de Olympus. A partir de las preparaciones de aplastados de espermátocitos se realizaron series de fotografías ("*stacks*") abarcando todo el volumen celular, capturando una imagen cada 0.2µm. En las preparaciones de esparcidos el volumen celular se pierde, por lo que sólo es necesario tomar una única imagen, ya que la célula queda proyecta en un plano focal. En determinados análisis se utilizó un microscopio confocal FV300 de Olympus, manejado mediante el "*software*" FluoView. (<http://www.olympusconfocal.com/products/index.html>). Finalmente las imágenes se procesaron con los "*software*" Adobe Photoshop 7.0 e Image J (National Institutes of Health, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij> ; <http://www.macbiophotonics.ca/imagej/> ).





## 1. “Western Blott”.

La inmunodetección mediante “western blott” en extracto proteico de testículos de saltamontes revela en todos los casos analizados la presencia de una banda con el peso molecular esperado para cada una de las proteínas analizadas (Figs. 8 y 9). En el caso de las proteínas pertenecientes a la familia de las SMC, SMC1 $\alpha$  y SMC3, detectadas con los anticuerpos SMC1 $\alpha$ \_k988 y SMC3\_Ch respectivamente, se detecta una banda a la altura del peso molecular de 140KDa, tanto en extracto de testículo de ratón, usado como control, como en el extracto de proteínas de testículo de saltamontes de la especie *L. migratoria*. También se analizaron estos anticuerpos en inmunoblott en extractos de células HeLa obteniendo una banda similar a las de ratón y saltamontes. Para la cohesina SA1 se detecta de una banda correspondiente al peso molecular de 130KDa tanto en el extracto de testículo de *E. plorans* y como en el extracto de *D. melanogaster*, usado como control. Por su parte, la inmunodetección de RAD21 revela la presencia de una banda a la altura de 120KDa en extracto de testículo de *L. migratoria* y en extracto control de células de *D. melanogaster* (Fig. 8).

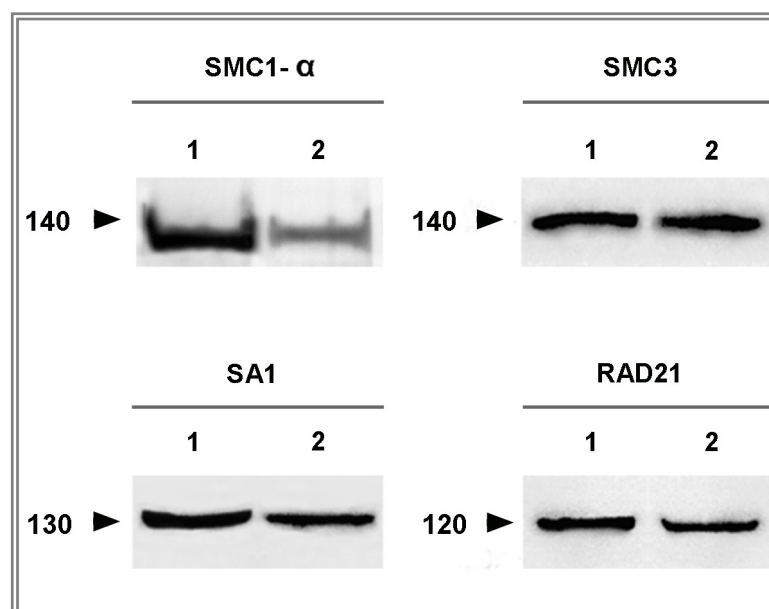
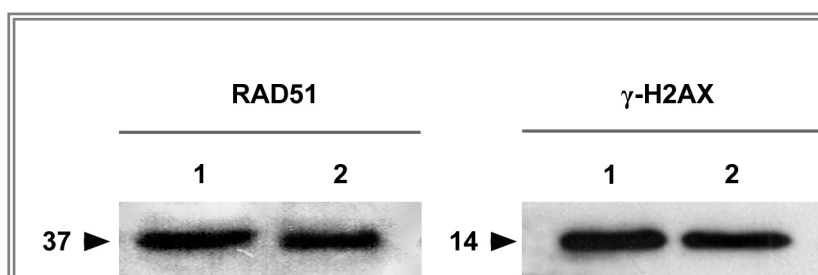


Figura 8. Análisis mediante inmunoblott de los anticuerpos policlonales SMC1 $\alpha$ \_k988, SMC3\_Ch, SA1\_277p y RAD21\_373 generados contra las subunidades de cohesina SMC1 $\alpha$ , SMC3, SA1 y RAD21 respectivamente. Se utilizaron extractos proteicos de testículo de ratón (1 en SMC1 $\alpha$  y SMC3), de testículo de *L. migratoria* (2 en SMC1 $\alpha$ , SMC3 y RAD21), de células de Schneider de *D. melanogaster* (1 en SA1 y RAD21) y de testículo de *E. plorans* (2 en SA1). Las cabezas de flecha indican la banda reconocida, la cual es de similar peso molecular entre los distintos controles (1) y el extracto de saltamontes (2), expresado en KDa. Los pesos moleculares están indicados en números a la izquierda de las cabezas de flecha.

Respecto a las proteínas no pertenecientes al complejo de cohesina analizadas en la presente memoria, cabe señalar que la inmunodetección de RAD51 mediante “western blott” revela una banda a la altura de 37KDa tanto en el carril donde se corrió el extracto de testículo de *L. migratoria*, como donde incorporamos extracto de testículo de ratón, usado como control. En el caso de la variante histónica  $\gamma$ -H2AX, donde se usaron el mismo tipo de extractos, observamos una banda que coincide con el peso molecular de 14KDa (Fig. 9).



**Figura 9. Análisis mediante inmunoblott de los anticuerpos generados contra las proteínas humanas RAD51 y  $\gamma$ -H2AX.** El número 1 indica el carril donde se corrió extracto de testículo de ratón como control y el número 2 donde se corrió extracto de testículo de saltamontes de la especie *L. migratoria*. El anticuerpo contra RAD51 reconoce en ambos casos una banda correspondiente al peso molecular de 37KDa. El anticuerpo para  $\gamma$ -H2AX reconoce tanto en saltamontes como en ratón una banda a la altura de 14KDa. Sus posiciones están indicadas con cabezas de flecha a la izquierda.

En todos los casos analizados, se observa una coincidencia entre la banda detectada en el control, sea ratón o *D. melanogaster* y el extracto de saltamontes. Estos datos indican el alto grado de conservación de todas estas proteínas. El motivo de usar extracto de testículo de ratón, de células Hela o de células de *D. melanogaster* como control radica en la secuencia que se tomó como referencia para generar cada anticuerpo.

## *Análisis de la Meiosis en especies sin restricción en la Recombinación ni en la Sinapsis.*

### ***2. Análisis de las cohesinas en espermatoцитos de E. plorans y L. migratoria.***

Ambas especies de saltamontes presentan una constitución cromosómica de 22 autosomas, un cromosoma X en machos y dos en las hembras, dando lugar a un determinismo cromosómico del sexo de X0 y XX respectivamente. Todos los cromosomas del complemento presentan una localización terminal del centrómero. Con el estudio de las cohesinas en espermatoцитos de saltamontes, pretendemos determinar la localización y distribución del complejo de cohesina en estas dos especies de Ortópteros, las cuales han sido modelo en estudios clásicos de citogenética. Los resultados que se presentan a continuación corroboran y amplían sustancialmente algunos de los resultados relativos a la localización de las cohesinas durante la profase I en aplastados de espermatoцитos publicados previamente por nuestro grupo de investigación (Valdeolmillos y col., 2007).

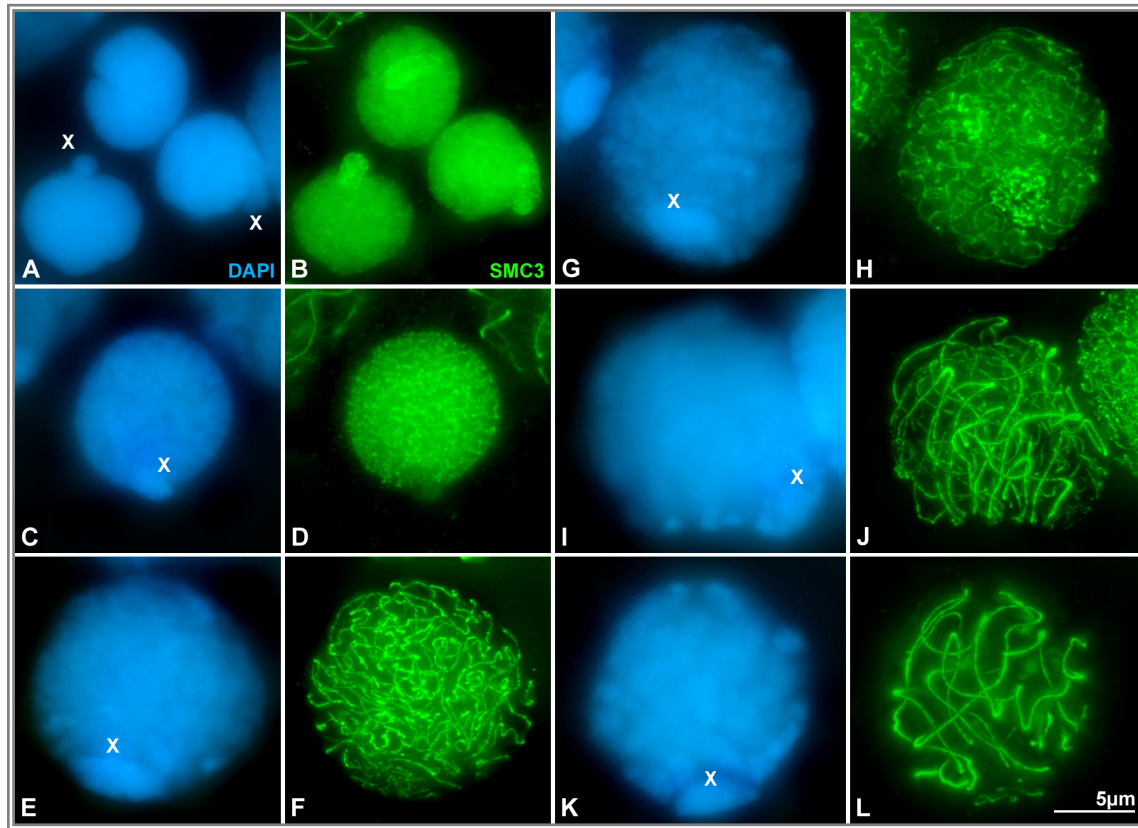
#### **2.1. Análisis de cohesinas SMC.**

Dada la importancia de las cohesinas de la familia SMC como eje central del llamado complejo de cohesina, empezaremos por analizar su patrón de localización, distribución y liberación durante la meiosis en estas dos especies de saltamontes. La inmunolocalización de SMC3 y SMC1 $\alpha$  se realizó tanto en aplastados como en esparcidos. A continuación se describen los resultados relativos a la localización de SMC3 en espermatoцитos de *L. migratoria*, pero debemos destacar que la detección de SMC1 $\alpha$  dio lugar a un patrón exactamente igual. Asimismo, el marcaje observado para ambas cohesinas es el mismo en machos de *E. plorans*.

##### **2.1.1. Las cohesinas SMC como marcadores de sinapsis.**

Mediante tinción con DAPI en aplastados de túbulos seminíferos de *L. migratoria*, se distinguen las espermatoгонias por la localización y condensación del cromosoma X, el cual se localiza en la periferia, observándose como una protrusión de cromatina más

condensada y con heteropicnoidad positiva (Fig. 10 A). La inmunolocalización de SMC3 revela un patrón difuso pero uniforme en todo el núcleo, no detectándose diferencias entre el cromosoma X y los autosomas (Fig. 10 B y video 3 del material suplementario ofrecido en CD\*).



**Figura 10. Inmunodetección de SMC3 en aplastados de *L. migratoria*: de gonias a paquitena.** La cohesina SMC3 se observa en verde. La cromatina está teñida con DAPI (azul). Todas las imágenes son proyecciones de varios planos focales. La posición del cromosoma X está marcada en la imagen de DAPI. (A y B) Espermatogonias con un marcaje de SMC3 en el núcleo uniforme. El cromosoma X se presenta como una protrusión nuclear. (C y D) Preleptotena. SMC3 forma finos trazos en toda la cromatina autosómica, no detectándose señal en la cromatina del cromosoma X. (E y F) En leptotena, SMC3 forma finos filamentos uniformemente distribuidos en el núcleo. El cromosoma X presenta también un eje de cohesina del mismo grosor, aunque ligeramente menos definido. (G y H) Inicio de cigotena. Se observan dos regiones de inicio de sinapsis. El grosor del eje de SMC3 en estas regiones es aproximadamente el doble que en el resto del núcleo. El cromosoma X presenta un filamento de SMC3 bien definido. (I y J) Cigotena media donde se distingue la configuración en "bouquet" y el eje de SMC3 del cromosoma X. (K y L) Paquitena donde se observan 11 filamentos gruesos de SMC3 que corresponden a los autosomas. El cromosoma X permanece en la periferia nuclear y muestra un eje de SMC3 de aproximadamente la mitad de grosor que el resto.

En etapas muy cercanas al inicio de la meiosis, el tamaño del núcleo aumenta ligeramente respecto a las espermatogonias y distinguimos con DAPI un estado muy inicial de compactación de la cromatina, este tipo celular lo consideramos preleptotena (Fig. 10 C). En esos núcleos observamos que el cromosoma X sigue apareciendo como una ligera protrusión, localizado en la periferia nuclear. Por su parte, el marcaje



detectado tras la inmunolocalización de la cohesina SMC3 muestra trazos discontinuos y homogéneos en la cromatina, exceptuando el cromosoma X, el cual presenta una tinción más difusa y débil (Fig. 10 D y video 4 del material suplementario ofrecido en CD). Los espermatoцитos en leptotena se caracterizan por presentar un núcleo con un diámetro ligeramente mayor al de las espermatoгонias, con la cromatina más condensada y el cromosoma X más integrado dentro del volumen nuclear, a pesar de seguir localizado en la periferia (Fig. 10 E). Este tipo celular presenta filamentos de SMC3 continuos, distribuidos por todo el núcleo (Fig. 10 F), denotando una maduración de los ejes de cohesina respecto a la etapa anterior. Esta primera detección de las cohesinas en forma de ejes en leptotena, se correspondería con la etapa donde se forman o maduran los EA, precursores de los EL del CS (Eijpe y col., 2000). El cromosoma X exhibe un eje de SMC3 del mismo grosor que los autosomas (Fig. 10 E y F y video 5 del material suplementario ofrecido en CD). En cualquier especie, el inicio de la sinapsis comienza con la asociación por parejas de los cromosomas homólogos mediante el ensamblaje del CS por la incorporación de los FT y la formación del EC. En saltamontes, según avanza el grado de compactación de la cromatina, se distinguen núcleos donde se observa el inicio de la asociación por parejas de los ejes de cohesina en una o dos regiones nucleares (Fig. 10 G y H y video 6 del material suplementario ofrecido en CD). Estas etapas se han identificado como inicio de cigotena o la transición leptotena-cigotena. En esta etapa también se observa en el cromosoma sexual un eje de cohesina similar al descrito en el estadio anterior.

Siguiendo con el progreso de la sinapsis, lo que se identifica como espermatoцитos en cigotena media muestran ejes de SMC3 que se asocian por parejas, dando lugar a filamentos gruesos y finos, que corresponderían con ejes donde ha progresado la sinapsis y regiones que están por sinapsar respectivamente (Fig. 10 I y J y video 7 del material suplementario ofrecido en CD). Es en esta etapa, donde el progreso de la sinapsis es más evidente y se distingue que los extremos de los ejes de cohesina se congregan en una región nuclear, polarizados en lo que sería la configuración en “bouquet” (Fig. 10 J). Además el eje simple de SMC3 del univalente sexual se polariza en dicha región nuclear. En paquitena se distinguen 11 filamentos gruesos de SMC3, que corresponderían a los 11 bivalentes autosómicos completamente sinapsados y un

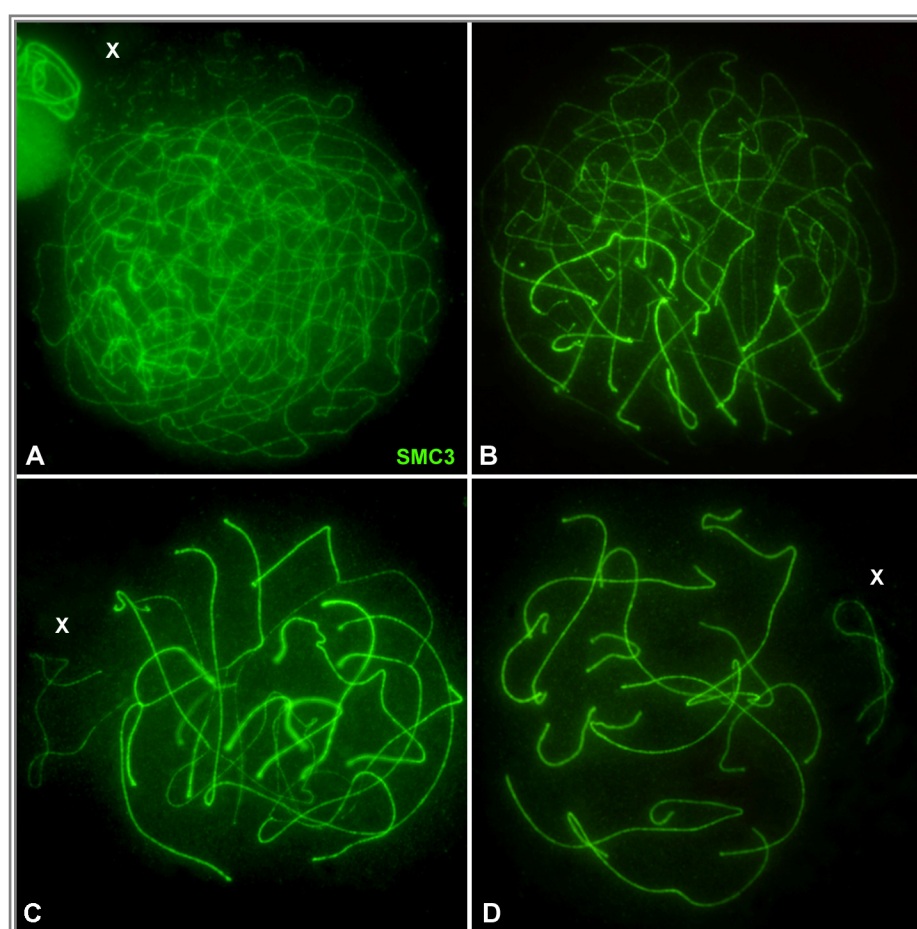
filamento fino, aproximadamente de la mitad de grosor que los anteriores, que sería el eje de cohesina del cromosoma X, el cual permanece desapareado (Fig. 10 K y L). Todos los extremos de los ejes de cohesina están situados en la periferia y parecen estar anclados a la envoltura nuclear. Este hecho se detecta claramente en una reconstrucción tridimensional de paquitenas realizada a partir de aplastados de espermatoцитos (Video 8 del material suplementario ofrecido en CD).

En esta Tesis Doctoral además hemos analizado la profase I sobre esparcidos de espermatoцитos de *L. migratoria*, observándose que la inmunodetección de la cohesina SMC3 muestra núcleos donde aparece un marcaje de ejes finos y continuos, además de un filamento del mismo grosor pero más irregular localizado en la periferia. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre aplastados, identificamos este tipo celular como espermatoцитos en leptotena, correspondiendo los ejes de cohesina finos y continuos a los autosomas y el eje de cohesina periférico al cromosoma X (Fig. 11 A). La etapa de cigotena se caracteriza por la asociación por parejas de los ejes de cohesina, dando lugar a ejes de cohesina gruesos y finos, por tanto reconocemos también en esparcido regiones sinapsadas y asinapsadas (Fig. 11 B y C). Con esta técnica es muy fácil distinguir ambos tipos de regiones cromosómicas así como las horquillas donde la sinapsis está progresando. De nuevo el cromosoma X se localiza hacia la periferia, en relación a los autosomas y presenta un eje de cohesina fino (Fig. 11 C). En paquitena se distinguen 11 ejes de cohesina gruesos, correspondientes al número de autosomas de las especies estudiadas. El univalente sexual permanece desapareado, presentando un eje de SMC3 fino (Fig. 11 D). Estas observaciones sobre esparcidos, al igual que ocurre sobre aplastados, se asemejan mucho a la progresión de la sinapsis y la formación del CS (Heyting, 1996)

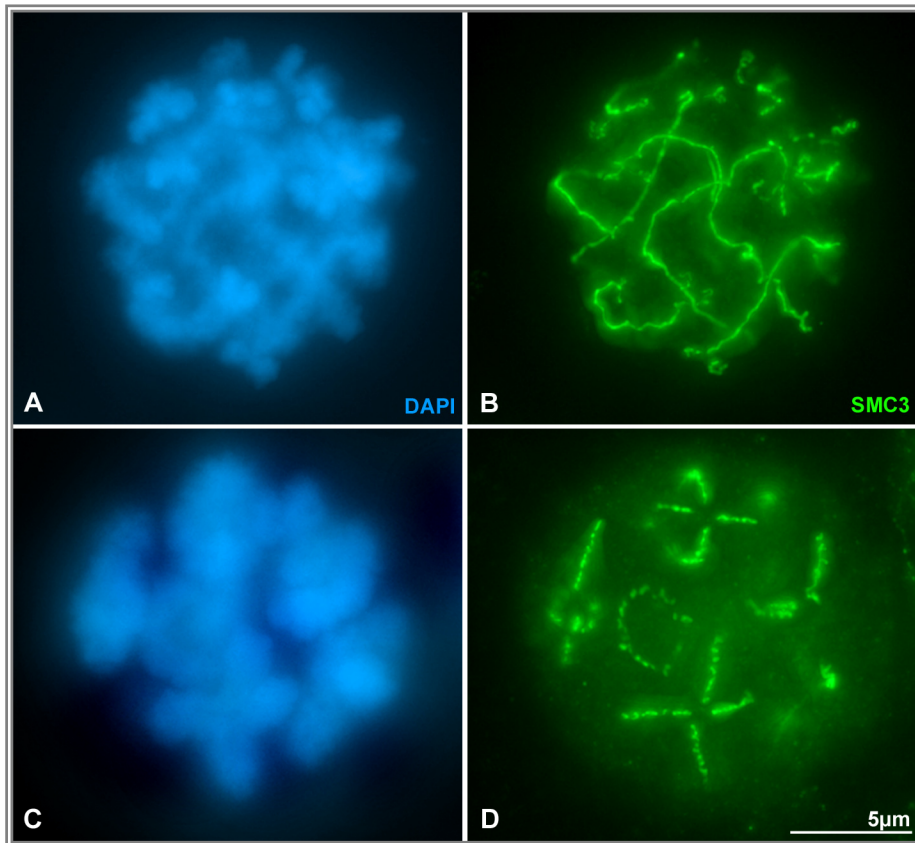
### **2.1.2. Las cohesinas SMC persisten en diplotena.**

En aplastados la desinapsis de los cromosomas homólogos en diplotena es evidente analizando la tinción con DAPI, observándose que en los núcleos aparecen estructuras más condensadas y ligeramente individualizadas. Estos espermatoцитos se caracterizan por ejes de SMC3 con apariencia irregular, presentando excrescencias a lo largo de su recorrido, confiriéndoles un aspecto que recuerda a un alambre de espino

(Fig. 12 A y B y video 9 del material suplementario ofrecido en CD). En diplotena tardía/diacinesis, la condensación de la cromatina es mayor y la visualización de los bivalentes como estructuras individuales es más evidente. La señal de SMC3 empieza a localizarse entre las cromátidas hermanas en el dominio intercromatídico de los bivalentes y del cromosoma X (Fig. 12 C y D y video 10 del material suplementario ofrecido en CD). En ninguna etapa de la profase I se detectan acumulaciones en los extremos cromosómicos ni con SMC3 ni con SMC1 $\alpha$ .

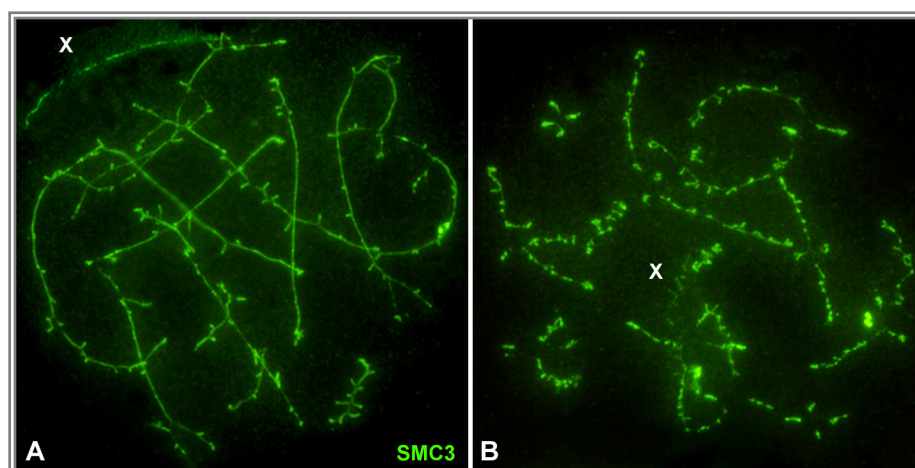


**Figura 11. Inmunodetección de SMC3 en esparcidos de espermatocitos de *L. migratoria*: de leptotena a paquítena.** (A) Leptotena. SMC3 se detecta como finos filamentos distribuidos por todo el núcleo. El cromosoma X se localiza en la periferia y presenta un eje discontinuo. (B) Cigotena temprana y (C) cigotena media. Los filamentos de SMC3 comienzan a asociarse por parejas en las zonas de sinapsis. (C) El cromosoma X, localizado en la periferia, presenta un fino y continuo eje de SMC3. (D) Paquítena. Podemos contar 11 filamentos autosómicos gruesos de SMC3 y el eje fino del cromosoma X.



**Figura 12. Inmunodetección de SMC3 en aplastados de *L. migratoria*: diplotena temprana y tardía.** La cohesina SMC3 se observa en verde. La cromatina está teñida con DAPI (azul). Todas las imágenes son la proyección de varios focales. (A y B) Diplotena temprana. Los ejes de SMC3 presentan excrecencias. (C y D) Diplotena tardía. En la cromatina teñida con DAPI se aprecian los bivalentes individualizados. SMC3 se localiza en el dominio intercromatídico. No se detectan acumulaciones en las regiones centroméricas.

En los espermatoцитos observados en esparcido, no es posible detectar la desinapsis de los cromosomas homólogos analizando la tinción con DAPI. Sin embargo, tras la inmunolocalización de SMC3 se distingue esta etapa por el aspecto de alambre de espino característico de los ejes de cohesina, observándose las mismas excrecencias que se han caracterizado con el aplastado (Fig. 13 A). En esta etapa podemos detectar 11 ejes de cohesina irregulares, correspondientes a los autosomas y un eje localizado en la periferia, algo más regular en su estructura, sin excrecencias laterales tan evidentes, que correspondería al eje de cohesina del cromosoma X. En diplotena tardía/diacinesis, las excrecencias de los ejes de SMC3 aumentan y se observa una localización correspondiente a la posición del dominio intercromatídico en todos los cromosomas. En esta etapa, el aspecto más lineal del eje de cohesina del cromosoma X, se pierde y aparece como un eje con organización en zigzag (Fig. 13 B).



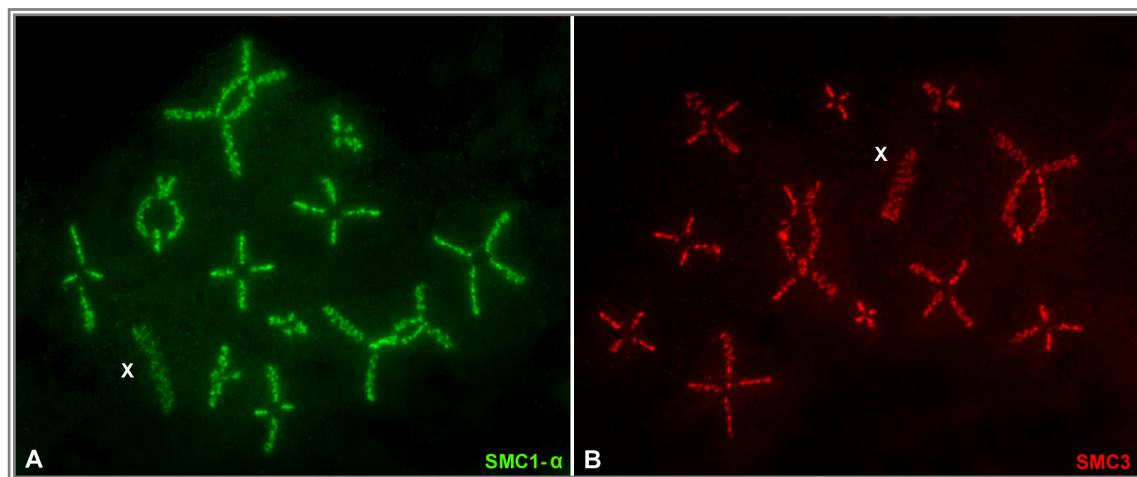
**Figura 13. Inmunodetección de SMC3 en esparcidos de espermatocitos de *L. migratoria*: diplotena y diacinesis.** Se contabilizan 11 ejes de SMC3 correspondientes a los autosomas y el del cromosoma X, el cual está marcado. (A) Diplotena tardía donde se distinguen excrecencias en los ejes de SMC3 en los autosomas. En los extremos de los bivalentes largos se aprecia cómo se desdobra el filamento de SMC3 en dos. El cromosoma X, marcado en la esquina superior izquierda, presenta un aspecto más lineal y fino que el resto, no distinguiéndose excrecencias evidentes en su trayectoria. (B) Diacinesis. SMC3 se localiza en el dominio intercromatídico. El cromosoma X presenta una señal que recuerda a un zigzag. Los autosomas presentan excrecencias en la señal de SMC3.

### 2.1.3. Distribución de las cohesinas SMC en cromosomas condensados.

Una vez finaliza la primera profase meiótica, la envoltura nuclear desaparece y los microtúbulos interaccionan con los cromosomas hasta conseguir la correcta bioorientación de los bivalentes en la placa metafásica. En los espermatocitos tratados con la técnica del esparcido, la envoltura nuclear no se mantiene y por lo tanto no podemos ayudarnos de ese dato para identificar las etapas meióticas. Sin embargo, cuando observamos meiocitos donde la condensación de los cromosomas es máxima, inferimos que se trata de células en metafase I, ya que según avanza el proceso meiótico la condensación de los cromosomas va siendo mayor, alcanzando el grado máximo precisamente en metafase I. En esta etapa, SMC3 y SMC1 $\alpha$  se localizan en el dominio intercromatídico, interrumpiéndose la señal tan sólo en el punto o puntos de quiasma en los autosomas (Fig. 14 A y B). En esparcidos la señal de las cohesinas SMC en metafase I, revela que los ejes de cohesina de todos los cromosomas presentan un aspecto en zigzag, el cual es más evidente en el univalente sexual.

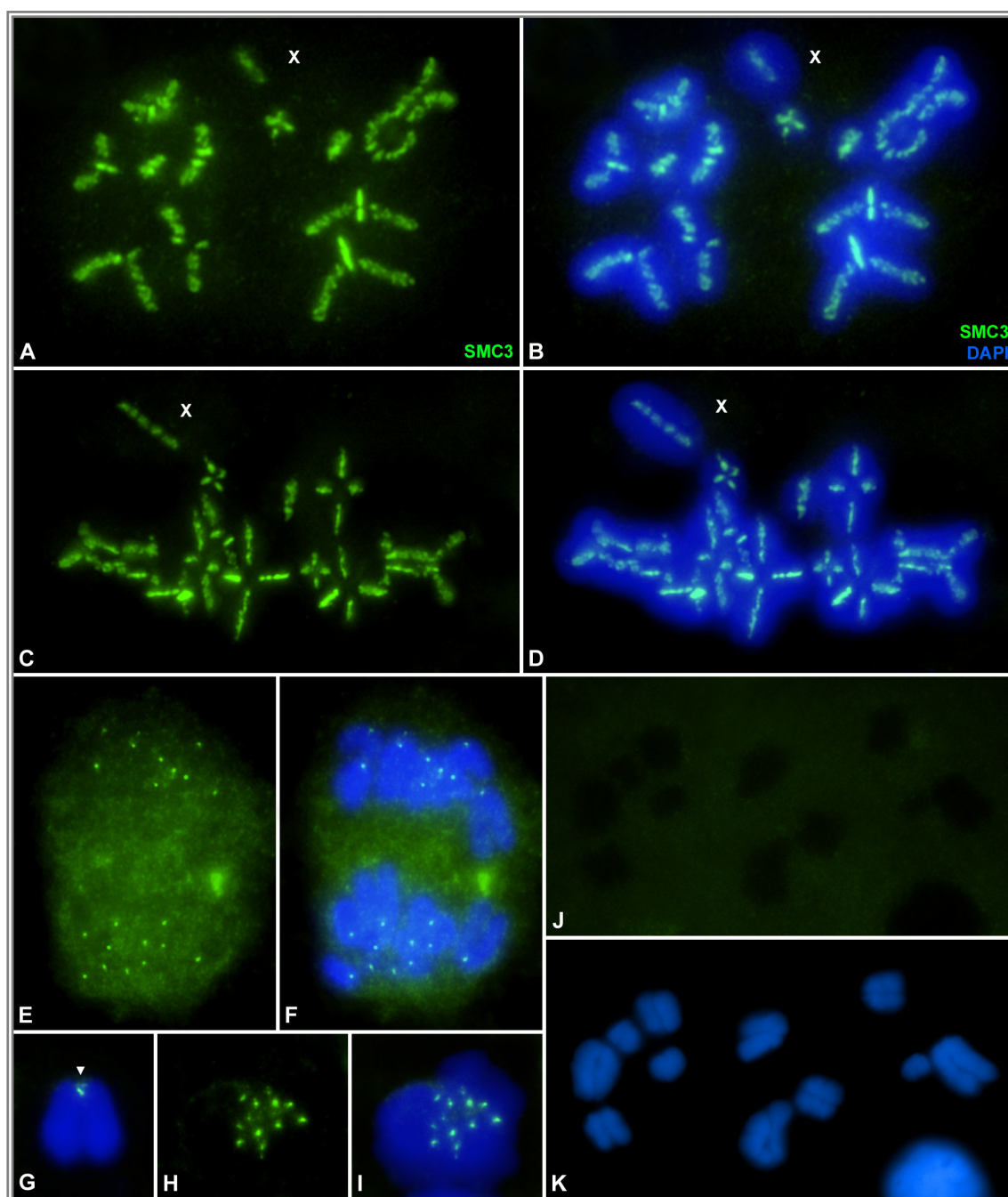
Debido a que en esparcidos la estructura del cromosoma puede verse afectada, consideramos más conveniente el análisis de la localización de las cohesinas en cromosomas condensados sobre aplastados. Con ésta técnica podemos incluso

distinguir entre prometafase I (Fig. 15 A y B) y metafase I (Fig. 15 B y C). En el primer caso no hay envoltura nuclear, pero los bivalentes no se encuentran alineados en placa. Cuando se observa una correcta alineación de los mismos decimos que es metafase I (Fig. 15 A-D y vídeos 11 y 12 del material suplementario ofrecido en CD). En ambos estadios de la meiosis la localización de SMC3 no varía respecto a la identificada en esparcido, observándose en el dominio intercromatídico de los bivalentes y en el X. Todos los cromosomas de las especies analizadas son telocéntricos, por lo tanto su posición en placa nos permite identificar los extremos centroméricos de los mismos. No hemos detectado una acumulación aparente de cohesina en la región centromérica, ni en ninguna otra región cromosómica. El marcaje de SMC3 tan sólo se encuentra interrumpido en los bivalentes en los puntos de quiasma. Si nos fijamos con detenimiento en la señal de SMC3 sobre cromosomas condensados en aplastado, distinguimos que no es una señal continua perfecta, sino que la superficie de contacto entre las cromátidas está ocupada por parches contiguos de SMC3. En la reconstrucción tridimensional de un bivalente en metafase I observamos que en vista lateral se configura una señal en zigzag de la cohesina (Fig. 15 A y C y video 13 del material suplementario ofrecido en CD).



**Figura 14. Inmunodetección de SMC1 $\alpha$  y SMC3 en esparcidos de espermatocitos de *L. migratoria*: metafase I.** La señal detectada tras el análisis de la inmunodetección de SMC1 $\alpha$  (verde en A) y SMC3 (rojo en B) en cromosomas en metafase I en esparcidos se localiza en el dominio intercromatídico de todos los cromosomas y presenta un aspecto en zigzag. En los bivalentes la señal se interrumpe en el quiasma. El cromosoma X está señalado en ambas imágenes.





**Figura 15. Inmunodetección de SMC3 en *L. migratoria*: cromosomas condensados.** Localización de la subunidad del complejo de cohesina SMC3 (verde) desde prometafase I hasta metafase II. La cromatina está teñida con DAPI en azul. Todas las imágenes corresponden a la proyección de varios planos focales. El cromosoma X aparece marcado en A, B, C y D. (A y B) Prometafase I. Los bivalentes no están alineados en placa pero se distinguen condensados e individualizados. (C y D) Metafase I. Todos los bivalentes se presentan alineados en placa. El cromosoma X queda ligeramente fuera de la placa metafásica. (A, B, C y D) La señal de SMC3 se detecta en el dominio intercromatídico de todos los cromosomas y se interrumpe en el punto o puntos de quiasma en los bivalentes. (E y F) Anafase I. La subunidad SMC3 se detecta como un punto bajo el centrómero de cada cromosoma. (G) Detalle de un cromosoma en anafase I con la señal de SMC3 bajo el centrómero (cabeza de flecha). (H e I) Telofase I donde se distinguen puntos de SMC3 que corresponden en número y posición a la localización de los centrómeros. (J y K) Metafase II. No detectamos señal de SMC3 sobre los cromosomas

La señal de las cohesinas SMC desaparece de los brazos cromosómicos en la transición metafase I – anafase I, persistiendo en anafase I como un punto ligeramente por debajo del centrómero entre ambas cromátidas, en todos los cromosomas (Fig. 15 E y F). Se puede localizar exactamente la posición del centrómero en cromosomas condensados, porque presenta una heteropicosidad negativa tras la tinción con DAPI, apareciendo los cinetocoros como un par de “agujeros” en los extremos cromosómicos, orientados hacia los polos celulares (Fig. 15 G). Este marcaje puntual en el centrómero observado con las cohesinas SMC, continúa en telofase I (Fig. 15 H e I). Sin embargo, en metafase II no hemos detectado señal de este tipo de cohesinas (Fig. 15 J y K) y no se observan en ninguna otra etapa de la meiosis, así como tampoco se han detectado en mitosis gonial.

## **2.2. Análisis de la cohesina SA1.**

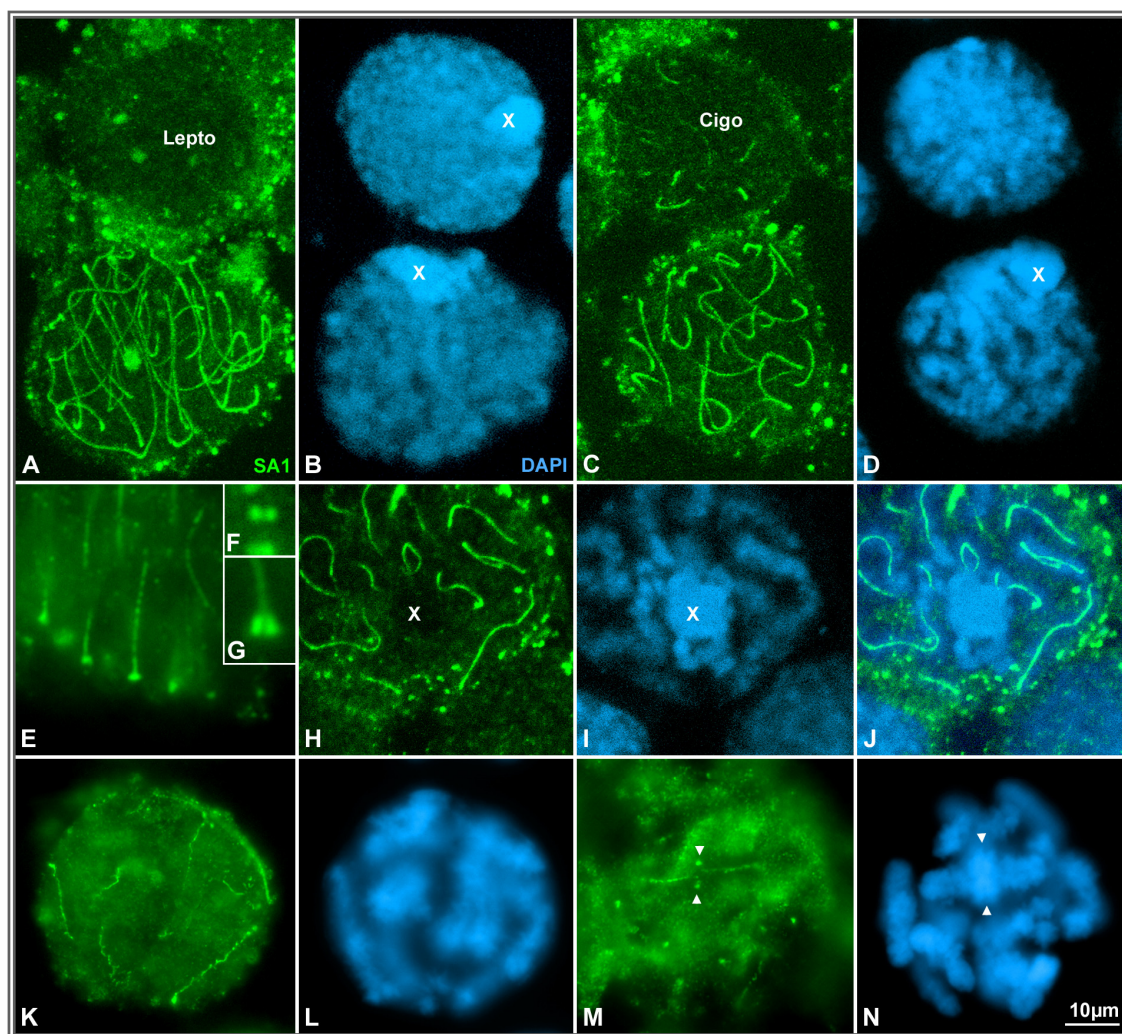
Siguiendo el protocolo descrito en el apartado de material y métodos para inmunolocalización, el anticuerpo utilizado contra la cohesina SA1 tan sólo dio resultados positivos en espermatoцитos de la especie *E. plorans*. No obstante, en el laboratorio hemos obtenido resultados similares en otras especies de saltamontes como *Chorthippus jucundus*.

### **2.2.1. SA1 se detecta en regiones de sinapsis.**

Tras la inmunolocalización de SA1 en aplastados de espermatoцитos de la especie *E. plorans* no se detecta dicha cohesina en el interior de núcleos en leptotena. (Fig. 16 A y B). En cigotena, la inmunolocalización de SA1 describe líneas discretas en el núcleo, cuyos extremos se polarizan en una región nuclear (Fig. 16 C y D). En paquitena, detectamos múltiples estructuras lineales en la cromatina cuyos extremos están muy cercanos a lo que sería la envoltura nuclear (Fig. 16 A-D). El análisis de este tipo de células muestra que el número de filamentos observados en las paquitenas corresponde exactamente con el número de bivalentes de la especie. Al observar con detenimiento los extremos de dichos filamentos se comprueba que presentan dos engrosamientos, los cuales en visión frontal aparecen como dos puntos bien definidos (Fig. 16 E-G). A la vista de estos resultados, se deduce que las primeras señales lineales que se observan en



cigotena, corresponden a los lugares de inicio de sinapsis. Lo que concuerda con los datos de paquitena, donde la sinapsis ha finalizado y por tanto se distinguen 11 ejes de SA1 correspondientes a los 11 bivalentes autosómicos del complemento cromosómico de la especie. Los engrosamientos que se observan en paquitena, podrían representar a las placas de asociación del CS, las cuales en cigotena se polarizan debido a la configuración en “*bouquet*” típica de este estadio meiótico.

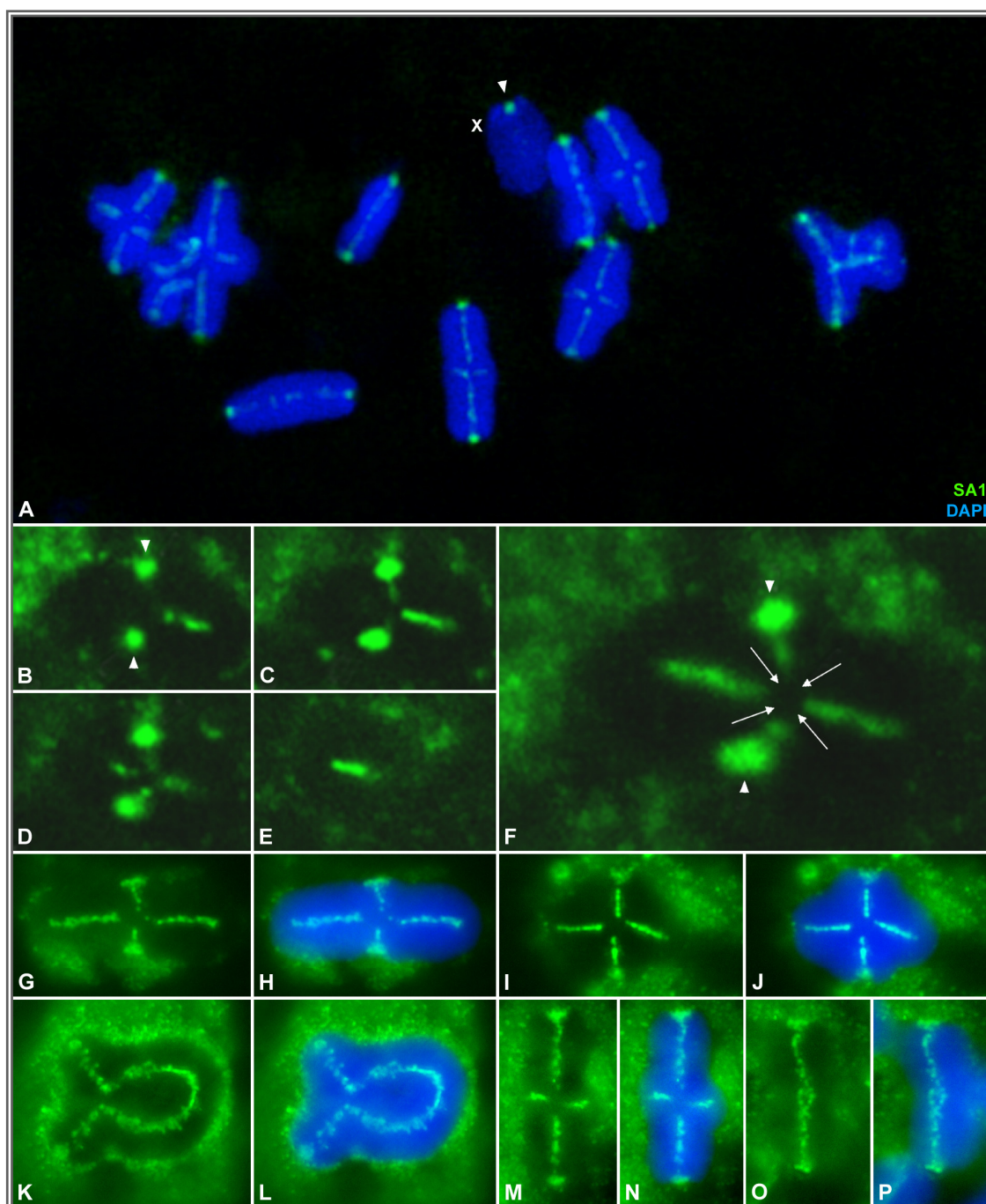


**Figura 16. Inmunodetección de SA1 (verde) en *E. plorans*: profase I.** La cromatina aparece en azul teñida con DAPI. Todas las imágenes corresponden a la superposición de diferentes planos focales. El cromosoma X aparece marcado en B, D, H e I. (A y B) Leptotena (Lepto), en la parte superior, y paquitena, en la inferior. En leptotena no se detecta señal de SA1 dentro del núcleo. En paquitena se observan filamentos continuos en todo el volumen nuclear. (C y D) Cigotena (Cigo) y paquitena en la parte inferior. En cigotena se distinguen cortos fragmentos de SA1. (E) Ampliación de la periferia de un núcleo en la etapa de paquitena donde se observa la acumulación de SA1 en los extremos de los filamentos. (F y G) Vista frontal (F) y lateral (G) magnificada de los extremos de los filamentos de SA1. (H e I) Proyección de los planos focales que abarcan el cromosoma X en paquitena. No se detecta señal de SA1 en el interior de su cromatina. (J) Superposición de la imagen H e I. (K y L) Diplotena temprana. Se distinguen excrescencias en los filamentos de SA1. (M y N) Diacinesis. El marcaje de SA1 se detecta en el dominio intercromatídico de los bivalentes y se acumula en los centrómeros (cabezas de flecha). Las imágenes de A, B, C, D, H, I y J están tomadas con un microscopio confocal, mientras que las de E, F, G, K, L, M y N son imágenes de microscopía de fluorescencia. La barra en N que indica la escala, no corresponde a las imágenes de E, F y G.

Un hecho destacable de la señal detectada con el anticuerpo contra SA1 es que nunca se detecta marcaje sobre el cromosoma X (Fig. 16 H-J). En este punto es importante recordar que el cromosoma X en los machos de esta especie aparece como un univalente natural que nunca sinapsa. Este hecho, junto con que la detección de SA1 sobre los cromosomas en profase I ocurre sólo a partir de cigotena, nos lleva a pensar que ésta cohesina se localiza de forma exclusiva sobre las regiones cromosómicas que completan la sinapsis. En diplotena las señales lineales de SA1 comienzan a aparecer más irregulares, con excrescencias laterales en toda su longitud excepto en los extremos (Fig. 16 K y L). Observamos de nuevo una apariencia de alambre de espino tal y como ocurría con las cohesinas SMC. Con el progreso de la condensación de la cromatina, en diacinesis el marcaje de SA1 se localiza en el dominio intercromatídico de los bivalentes y se observan acumulaciones en las regiones centroméricas (Fig. 16 M y N).

### **2.2.2. SA1 se acumula en los centrómeros en metafase I.**

En metafase I, SA1 se detecta en el dominio intercromatídico de los bivalentes, interrumpiendo su señal en el punto de quiasma. Además observamos que se acumula en los extremos centroméricos de todos los cromosomas, incluido el cromosoma X, aunque no hemos detectado señal de SA1 en el dominio intercromatídico del univalente sexual (Fig. 17 A). La acumulación de la cohesina en la región centromérica en metafase I se comprueba tanto en el análisis de los diferentes planos focales, tomados de una serie de un bivalente con un quiasma intersticial analizado con microcopía confocal (Fig. 17 B-F), como en su reconstrucción tridimensional (Video 14 del material suplementario ofrecido en CD). Esta acumulación en la región centromérica se distingue en todos los bivalentes, independientemente del número o posición de los quiasmas (Fig. 17 G-P). Para asegurarnos de que esa acumulación se corresponde con la localización de la región centromérica, realizamos una doble inmunolocalización de SA1 y MPM2 (Fig. 18). El anticuerpo denominado MPM2 detecta diferentes proteínas fosforiladas, principalmente la Topoisomerasa II $\alpha$ . Tras su inmunolocalización se ha observado que marca el dominio intercromatídico y los cinetocoros en bivalentes de saltamontes en metafase I (Suja y col., 1999).



**Figura 17. Metafase I tras la inmunodetección de SA1 en *E. plorans*.** La señal de SA1 se muestra en verde y la cromatina teñida con DAPI en azul. Las imágenes en A y de F a P son la proyección de diferentes planos focales. De A a F son imágenes de microscopía confocal, mientras que las imágenes restantes son de microscopía de fluorescencia. (A) Metafase I. En todos los cromosomas se acumula SA1 en los centrómeros, incluso en el cromosoma X (cabeza de flecha), pero sólo en los bivalentes se detecta SA1 en el dominio intercromatídico. (B-E) Distintos planos focales de un bivalente monoquiasmático en metafase I donde se distingue la acumulación de SA1 en los centrómeros (cabezas de flecha en B). (F) Suma de los diferentes planos focales del mismo bivalente donde se observa la acumulación de SA1 en los centrómeros (cabezas de flecha) y el punto de quiasma (flechas) donde se interrumpe la señal del dominio intercromatídico. (G-O) Bivalentes con señal en el dominio intercromatídico, excepto en el punto o puntos de quiasma y acumulación de SA1 en centrómeros, los cuales están orientados hacia arriba y hacia abajo de cada imagen. (G y H) Bivalente con quiasma intersticial-proximal o subproximal. (I y J) Bivalente con quiasma intersticial. (K y L) Bivalente con dos quiasmas. (M y N) Bivalente con quiasma intersticial-distal o subdistal. (O y P) Bivalente con quiasma distal.



Los resultados de la doble inmunolocalización muestran que tanto SA1 como MPM2 se acumulan en la región centromérica y están presentes en el dominio intercromatídico de bivalentes autosómicos en metafase I obtenidos con microscopia óptica de fluorescencia (Fig. 18 A-D). Sin embargo, el marcaje en el cromosoma X es distinto, mientras MPM2 marca tan sólo el centrómero, SA1 se acumula en el centrómero y en el telocoro, pero ninguno de los dos anticuerpos se detecta en el dominio intercromatídico en metafase I (Fig. 18 E-H). El telocoro fue descrito como una diferenciación del extremo distal de los ejes de las cromátidas (Suja y Rufas, 1994). Si nos fijamos en la tinción con DAPI de los cromosomas condensados en metafase I, podemos distinguir que la región centromérica presenta una heteropícnosis negativa, lo que hace sencilla su localización sin necesidad de tener un marcador de centrómero (Fig. 17 H, J, L, N y P y Fig. 18 D y H). Esta circunstancia es común en todas las especies analizadas y se tendrá en cuenta de aquí en adelante cuando se analicen cromosomas condensados. Así mismo, para la identificación del centrómero también resulta útil el hecho de que todos los cromosomas del complemento sean telocéntricos.

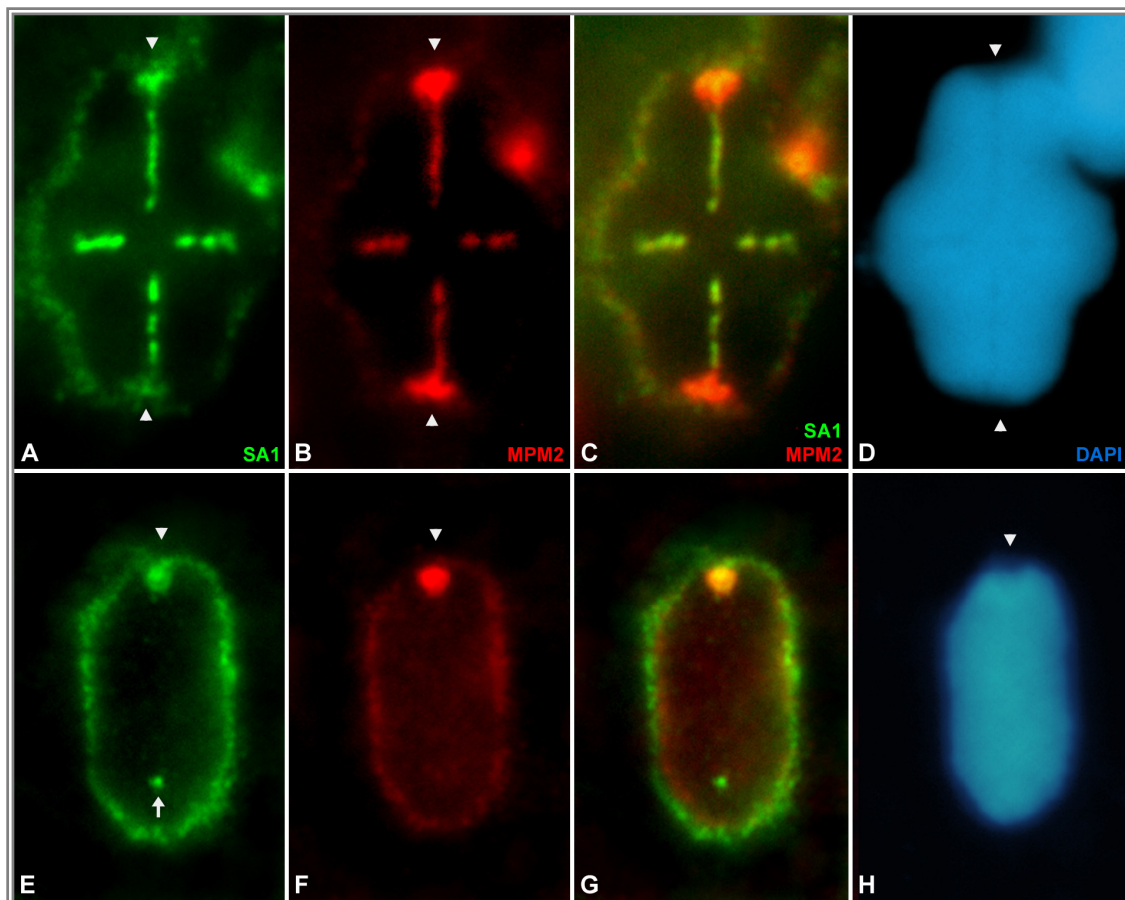


Figura 18: Doble inmunolocalización de SA1 y MPM2 en metafase I en *E. plorans*.

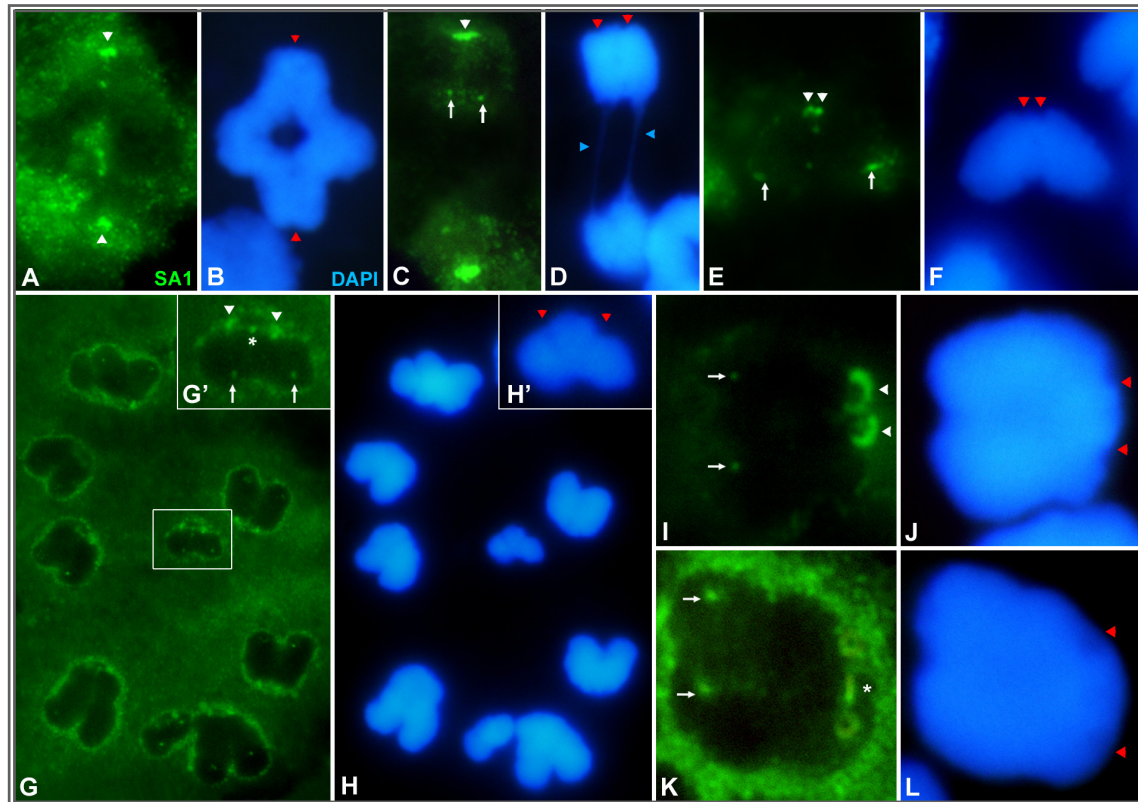
### 2.2.3. SA1 permanece en la región centromérica en la segunda división meiótica.

En la transición metafase I – anafase I la señal de SA1 desaparece de los brazos cromosómicos de los bivalentes (Fig. 19 A y B) pero el marcaje en la región centromérica persiste hasta metafase II (Fig. 19 A-H). El marcaje de SA1 observado en bivalentes en la transición metafase I – anafase I y en los cromosomas en anafase I temprana, muestra una banda entre los cinetocoros hermanos (Fig. 19 A-D). A partir de anafase I detectamos un punto en el extremo distal de cada cromátida. Esta señal es similar a la encontrada en el cromosoma X en metafase I y que hemos identificado como el telocoro (Fig. 19 C y D). Un dato curioso es que en anafase I temprana, hemos observado la presencia de puentes de cromatina entre las cromátidas homólogas, los cuales serían el último punto de contacto entre los cromosomas homólogos antes de su completa separación, pero que en ningún caso han aparecido positivos con ninguna de las cohesinas analizadas (Fig. 19 D). En el progreso de la anafase I, la señal de SA1 observada se distingue como dos puntos individualizados, cuya posición concuerda con la de los cinetocoros hermanos (Fig. 19 E y F). En metafase II, los cromosomas presentan una intensa señal de SA1 sobre los cinetocoros y un punto entre ellos, así como también somos capaces de detectar un punto distal correspondiente al telocoro en cada cromátida (Fig. 19 G, G', H y H'). Si analizamos con detenimiento un cromosoma en metafase II, en vista lateral observamos que el intenso marcaje sobre los cinetocoros tiene forma de “copa” o de “C” (Fig. 19 I y J). Asimismo, en vista semi-frontal, SA1 se detecta como un anillo alrededor de cada cinetocoro y adicionalmente aparece una banda entre ellos (Fig. 19 M y N). En todo momento la tinción con DAPI permite detectar la posición exacta de los cinetocoros. En anafase II y telofase II sigue estando presente el marcaje de SA1 en los cinetocoros, pero en ningún momento se ha detectado esta cohesina, con el anticuerpo utilizado, en cromosomas mitóticos (datos no mostrados).

---

◀**Figura 18. Doble inmunolocalización de SA1 y MPM2 en metafase I en *E. plorans*.** Doble inmunolocalización de SA1 (verde) y MPM2 (rojo) sobre un bivalente (A-D) y un cromosoma X (E-H). En C y G se muestra la superposición de los dos anticuerpos y en D y H en azul la cromatina teñida con DAPI. Todas las imágenes son una proyección de varios planos focales. Los centrómeros están marcados con cabezas de flecha. Tanto SA1 como MPM2 muestran una señal a parches en el dominio intercromatídico del bivalente (A y B) pero están ausente de esa región en el X (E y F). SA1 y MPM2 se acumulan en los centrómeros. SA1 además se detecta en el telocoro del cromosoma X (flecha en E).

---



**Figura 19. Inmunodetección de SA1 (verde) en *E. plorans*: anafase I y metafase II.** Todas las imágenes son la suma de distintos planos focales. La cromatina aparece en azul (DAPI). La señal centromérica de SA1 se marca con cabezas de flecha blancas y sobre el DAPI con cabezas de flecha rojas. Las flechas blancas marcan los telocoros. (A y B) Bivalente en la transición metafase I – anafase I. SA1 está presente en los centrómeros. (C y D) Bivalente en anafase I temprana. SA1 se acumula en el centrómero como una banda entre ambos cinetocoros y marca una pequeña señal en los telocoros. Las cabezas de flecha azules en D marcan el último punto de contacto entre los cromosomas homólogos. (E y F) Detalle de un cromosoma en anafase I. SA1 se detecta como dos puntos muy juntos en el extremo centromérico. Los telocoros presentan tinción con SA1. (G y H) Metafase II. En el centro se destaca la señal de un cromosoma, amplificado en G' y H'. SA1 se acumula en los cinetocoros hermanos y se distingue un punto entre ellos (asterisco), además de los telocoros. (I y J) Ampliación de un cromosoma en metafase II en vista lateral con intenso marcaje de SA1 en forma de copa sobre cada cinetocoro hermano. (K y L) Ampliación de un cromosoma en metafase II en vista semi-frontal. Se observa una señal en anillo de SA1 en los cinetocoros, una banda entre ellos (asterisco) y un punto en cada telocoro (I-L).

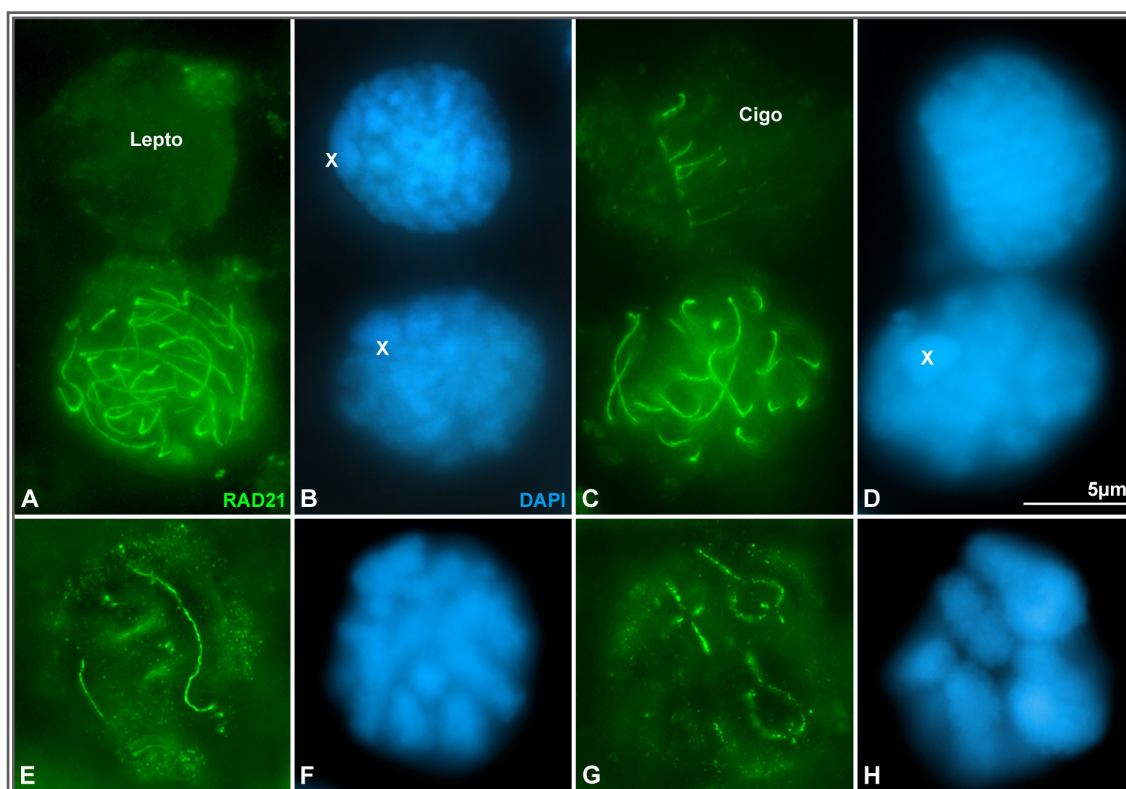
### 2.3. Análisis de la cohesina RAD21.

Al contrario de lo que ocurría con SA1, RAD21 se detectó en *L. migratoria*, mientras que en *E. plorans* no se obtuvo ningún dato positivo tras su inmunodetección.

#### 2.3.1. La detección de RAD21 coincide con la sinapsis.

Los espermatocitos en leptotena no muestran señal de RAD21, ni en el interior del núcleo, ni en la periferia (Fig. 20 A y B). En cigotena se detectan discretas líneas de RAD21 polarizadas en una determinada región nuclear, recordando a una configuración en “bouquet” (Fig. 20 C y D). En paquitena se detecta una señal de RAD21 que conforma líneas continuas, cuyos extremos están muy próximos a la envoltura nuclear (Fig. 20 A-

D). Analizando mediante reconstrucción tridimensional este tipo de células, se observa que el número de líneas corresponde al número de bivalentes de la especie (Video 15 del material suplementario ofrecido en CD). Al igual que ocurría con la cohesina SA1, RAD21 no se detecta en el cromosoma sexual (Fig. 20 A-D y Fig. 21 A-C).

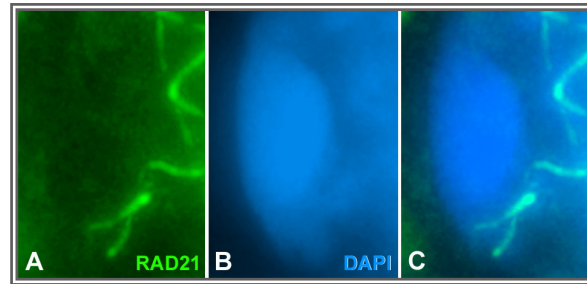


**Figura 20. Inmunolocalización de RAD21 en *L. migratoria*: profase I.** Todas la imágenes son la suma de distintos planos focales. La detección de RAD21 se muestra en verde y la cromatina en azul por la tinción con DAPI. El cromosoma X aparece marcado sobre la cromatina en B y D. (A y B) Leptotena (Lepto) y paquítena en la parte inferior. En leptotena no se distingue señal de RAD21. En paquítena, RAD21 forma estructuras lineales en todo el núcleo excepto sobre la cromatina del cromosoma X. (C y D) Cigotena (Cigo) y paquítena, en la parte de inferior de la imagen. En cigotena RAD21 se detecta como cortos fragmentos coincidiendo con la base del “bouquet”. En paquítena no detectamos señal de RAD21 sobre el cromosoma X. (E y F) Diplotena. RAD21 presenta una apariencia de filamentos con excrescencias. (G y H) Diacinesis. RAD21 se localiza en el dominio intercromatídico de los bivalentes.

En diplotena se observa que la señal lineal de RAD21 adquiere un aspecto más irregular. Al igual que ocurría con SMC3 y SA1, tras la inmunodetección de RAD21 se observan excrescencias en los filamentos de cohesina en diplotena y de nuevo se visualiza lo que hemos denominado un aspecto de alambre de espino (Fig. 20 E y F). En diacinesis, RAD21 aparece localizada en el dominio intercromatídico de los bivalentes (Fig. 20 G y H). La secuencia observada tras la inmunolocalización de RAD21 es similar, en espacio y tiempo, a la descrita por



SA1 en la primera profase meiótica, con la excepción de la acumulación en las placas de asociación y en las regiones centroméricas de los cromosomas. Nuevamente, la carga de RAD21 sobre los cromosomas meióticos parece estar relacionada con el progreso de la sinapsis



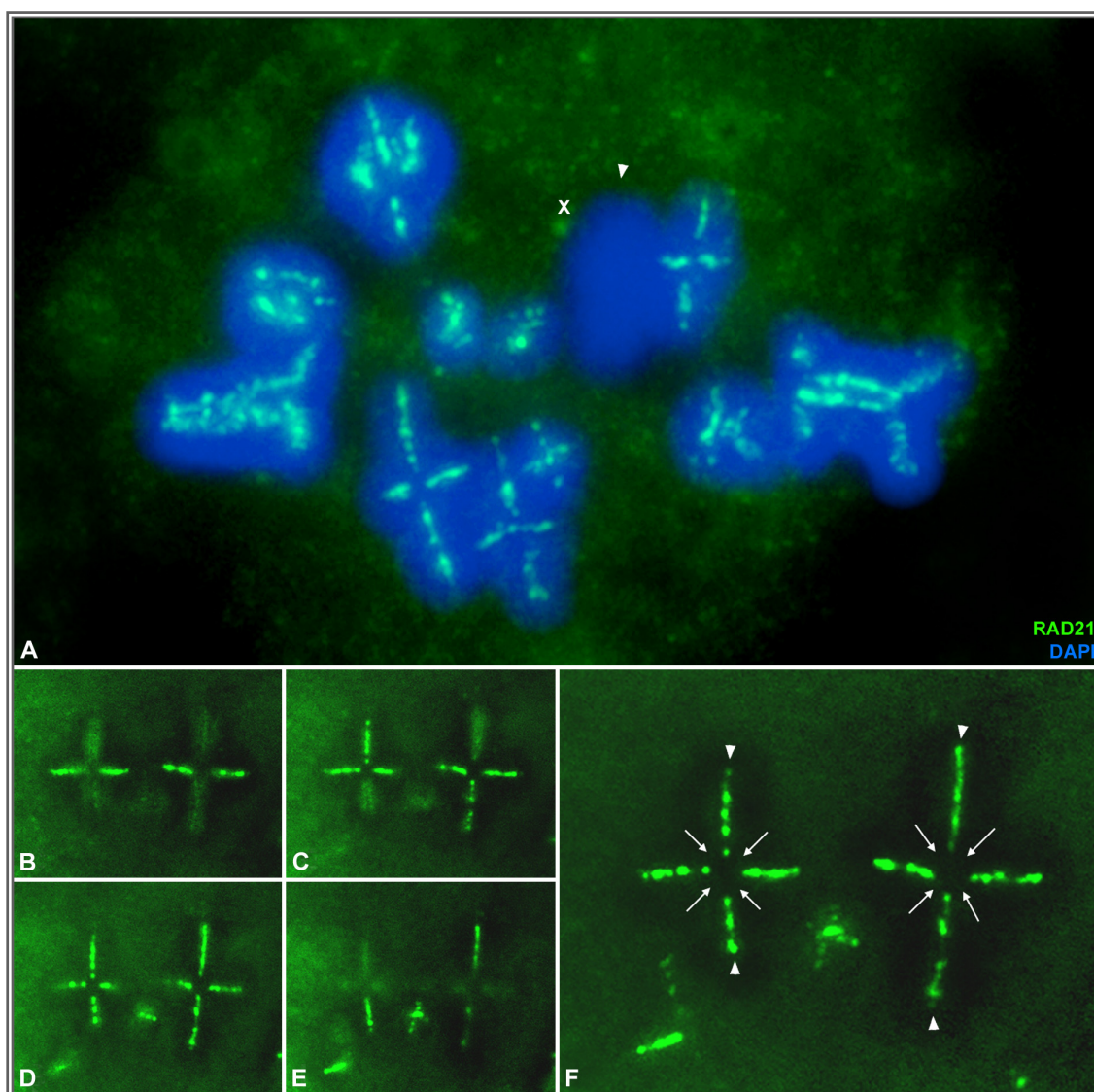
**Figura 21. Ampliación del cromosoma X de *L. migratoria* en paquitena.** Inmunodetección de RAD21. Suma de todos los planos focales correspondientes al volumen ocupado por el univalente sexual. RAD21 está en verde (A) y la cromatina teñida con DAPI en azul (B). La superposición de las dos señales se muestra en C. RAD21 no se detecta en la cromatina del cromosoma X.

### 2.3.2. Distribución de RAD21 en metafase I.

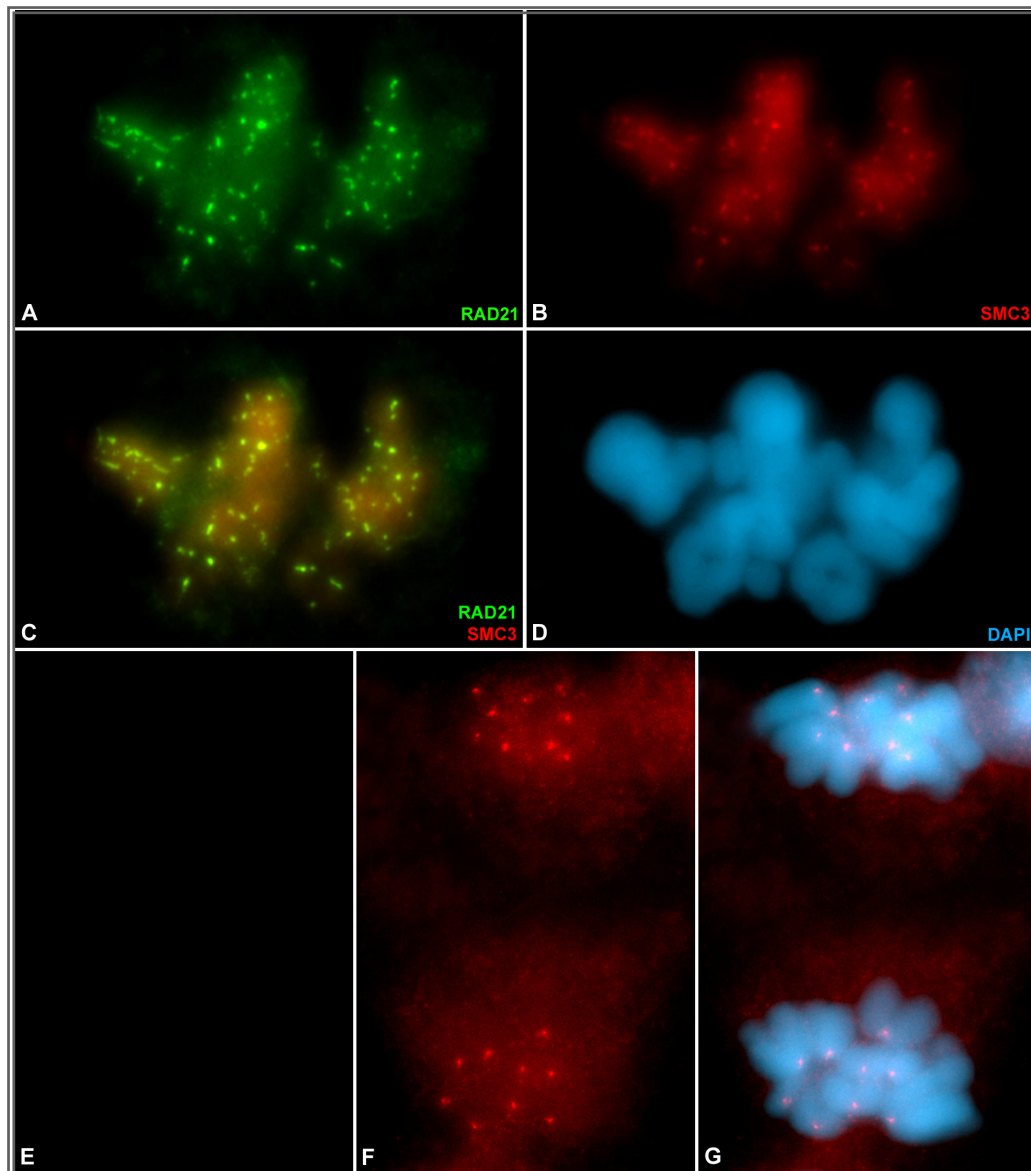
En metafase I la inmunolocalización de RAD21 revela que esta cohesina está presente en el dominio intercromatídico de los bivalentes, excepto en el punto o puntos de quiasma. Sin embargo, no se detecta en el dominio intercromatídico del cromosoma X y tampoco se observa ninguna acumulación en los extremos cromosómicos, ni de los autosomas ni del univalente sexual (Fig. 22 A). Esto se puede determinar con seguridad, tras el aplastado de espermatozoides, mediante el análisis de los diferentes planos focales de un bivalente con un quiasma intersticial obtenidos en un microscopio motorizado en el eje Z (Fig. 22 B-F) o mediante su reconstrucción tridimensional (Video 16 del material suplementario ofrecido en CD). Si observamos detenidamente un bivalente en metafase I, distinguimos que RAD21 muestra una señal a parches contiguos en visión frontal, pero en visión lateral adquiere una configuración en zigzag entre las cromátidas hermanas (Video 17 del material suplementario ofrecido en CD). El marcaje de RAD21, al contrario que SA1 o que SMC3, desaparece en la transición metafase I – anafase I. Esta afirmación es fácilmente observable tras la doble inmunolocalización de SMC3 y RAD21 (Fig. 23), donde RAD21 no se detecta en anafase I, frente a los puntos observados bajo



los centrómeros de todos los cromosomas con SMC3. RAD21 no se detecta en ninguna otra etapa de la meiosis posterior a metafase I, ni en mitosis.



**Figura 22. Inmunodetección de RAD21 en metafase I de *L. migratoria*.** Las imágenes A y F son la suma de diferentes planos focales. RAD21 se muestra en verde y la cromatina teñida con DAPI en azul. (A) Metafase I completa. Los 11 bivalentes presentan señal de RAD21 en el dominio intercromatídico. En el cromosoma X no se detecta señal de RAD21. El centrómero del X se marca con una cabeza de flecha blanca en A. (B-E) Distintos planos focales de dos bivalentes con un quiasma intersticial. (F) Suma de los distintos planos focales de los dos bivalentes. RAD21 se detecta a parches en el dominio intercromatídico, excepto en el punto de quiasma (flechas) y no se detecta acúmulos de la proteína en los centrómeros (cabezas de flecha en F).

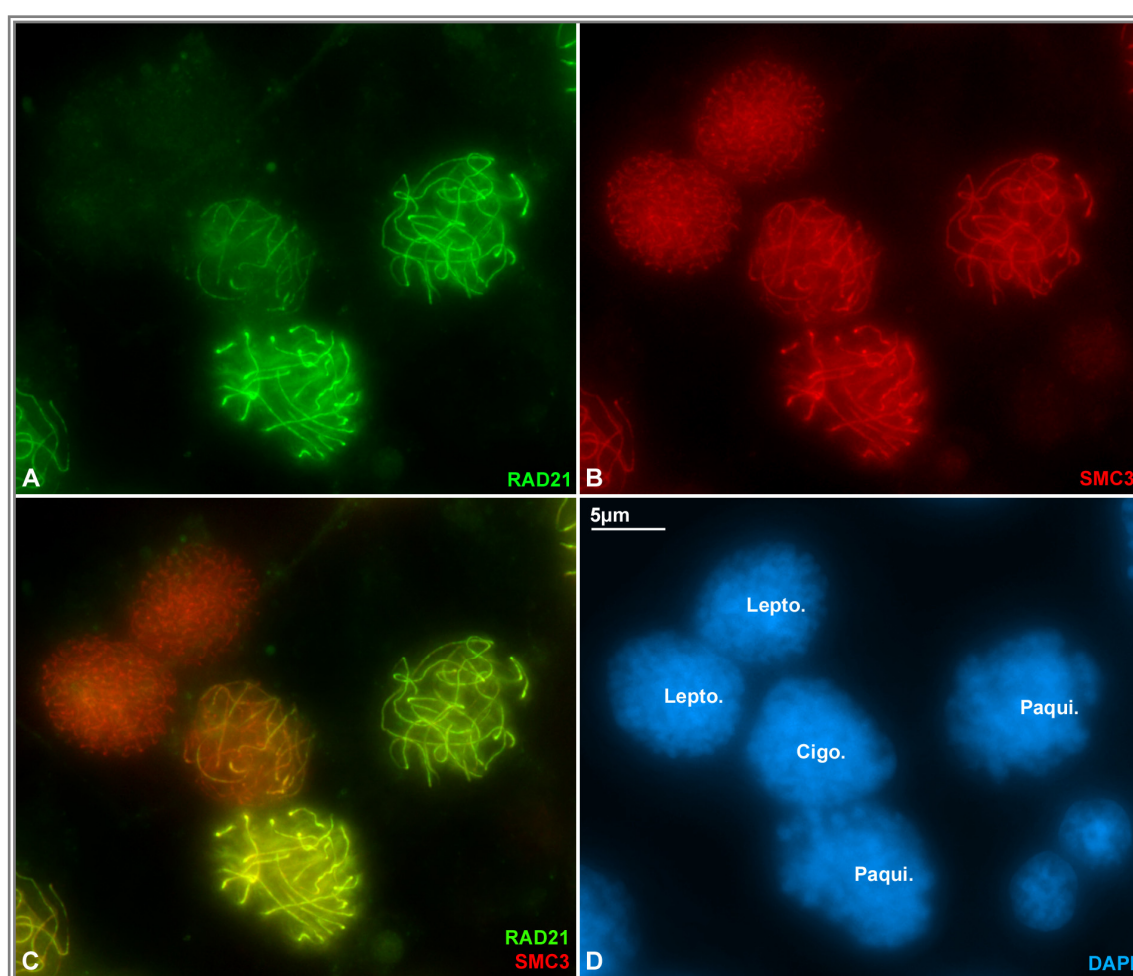


**Figura 23. Doble inmunolocalización de RAD21 y SMC3 en *L. migratoria*: anafase I.** Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. El marcaje de RAD21 se muestra en verde y el de SMC3 en rojo. La cromatina se observa en azul tras la tinción con DAPI. (A-D) Transición metafase I – anafase I. RAD21 (A) y SMC3 (B) se detectan a puntos distanciados unos de otros en el dominio intercromatídico. (C) Superposición del marcaje de RAD21 y SMC3. (E-G) Anafase I. RAD21 no se detecta sobre los cromosomas (E) mientras que SMC3 se observa como un punto bajo cada centrómero (F).

#### **2.4. Detección secuencial y no colocalización de SMC3 y RAD21.**

El análisis por separado de SMC3, SMC1 $\alpha$ , SA1 y RAD21 indica que, mientras SMC3 y SMC1 $\alpha$  se observan como ejes de cohesina en etapas previas a la formación del CS, SA1 y RAD21 no se detectan en núcleos meióticos hasta cigotena. Para este desfase temporal observado en la detección entre ambos tipos de cohesinas, se puede comprobar mediante la doble inmunolocalización de SMC3 y RAD21 (Fig. 24-26). En

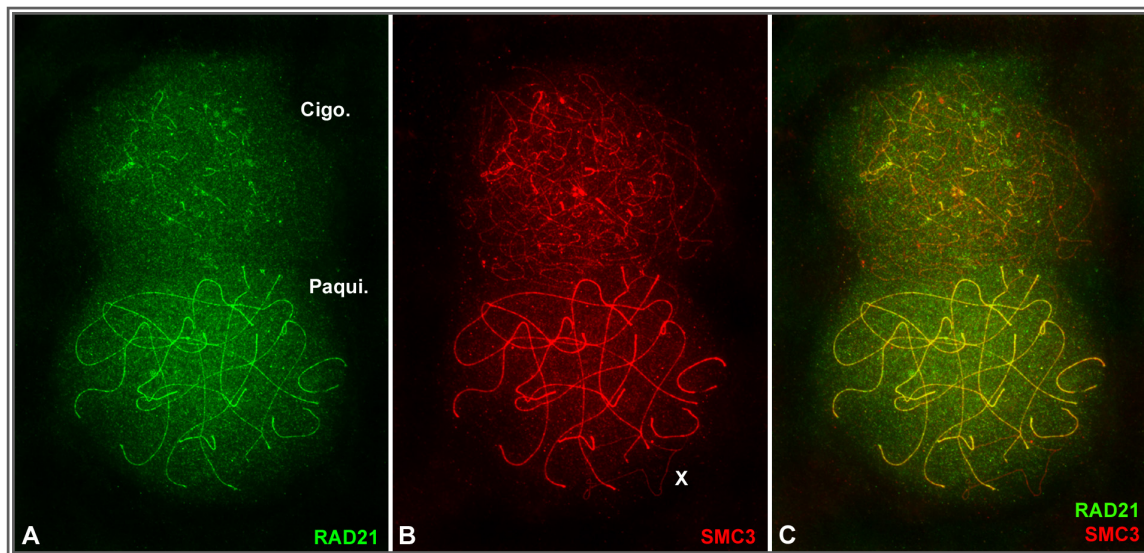
aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria* se observa que mientras la inmunolocalización de SMC3 revela ejes finos en leptotena, en ese tipo celular no se observa ninguna señal de RAD21 (Fig. 24 y video 18 del material suplementario ofrecido en CD). En cigotena, se distingue que RAD21 aparece como cortos filamentos que colocan con SMC3 sólo en las regiones de sinapsis. Mientras tanto, con SMC3 se detectan filamentos en todo el núcleo y se distinguen regiones de sinapsis y regiones aún por sinapsar (Fig. 24). En paquitena se detecta una colocación completa de ambas cohesinas en los autosomas, dando lugar a núcleos donde se observan 11 filamentos amarillos tras la superposición de ambos marcajes.



**Figura 24. Doble inmunolocalización de RAD21 y SMC3 en *L. migratoria*: profase I.** Campo de espermatoцитos tras ser tratados con la técnica del aplastado y marcados con RAD21 en verde (A) y SMC3 en rojo (B). La superposición de ambos marcajes aparece en C. La cromatina está teñida en azul con DAPI (D), sobre la que se identifican los distintos espermatoцитos en su etapa meiótica: Leptotena (Lepto), cigotena (Cigo) y paquitena (Paqui). RAD21 no se detecta en leptotena. La señal de RAD21 y de SMC3 tan sólo colocan completamente en las regiones sinapsadas de cigotena y en paquitena (regiones identificadas en amarillo)



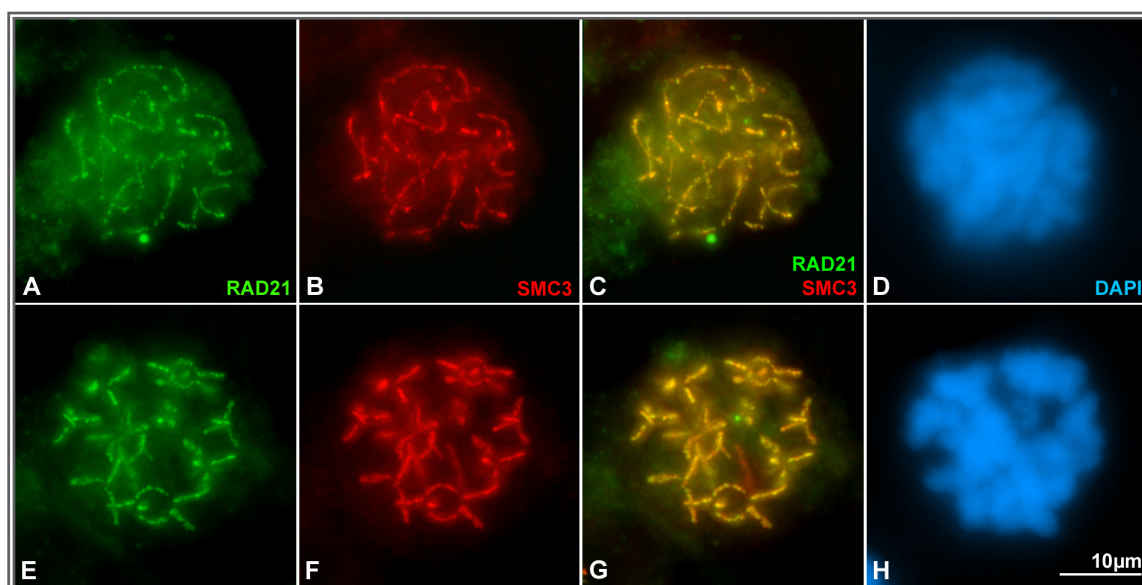
Estos resultados, observados en aplastados (Fig. 24) se comprobaron en esparcidos analizados tanto con microcopia de fluorescencia (Fig. 25) como confocal. En los esparcidos es además fácilmente perceptible el hecho de que el eje de cohesina del cromosoma X sólo se detecta con SMC3 y no con RAD21 y que en paquitenia ambas cohesinas colocalizan.



**Figura 25.** Doble inmunolocalización de RAD21(verde en A) y SMC3 (rojo en B) en esparcidos de espermatoцитos de *L. migratoria*: cigotena y paquitenia. Cigotena temprano (Cigo) y paquitenia (Paqui). (C) Superposición de RAD21 y SMC3. En cigotena temprano RAD21 aparece como cortos filamentos mientras que SMC3 describe finos ejes de cohesina en todo el núcleo. Ambos marcajes colocalizan en las regiones de inicio de sinapsis en cigotena (regiones en amarillo en C). En paquitenia RAD21 y SMC3 describen la misma señal, colocalizando completamente, excepto en el cromosoma X, cuyo eje de cohesina podemos observar con SMC3 (B) pero no con RAD21 (A).

En diplotena, la detección conjunta de SMC3 y RAD21 revela que, a pesar de que ambas cohesinas exhiben una señal de ejes con excrescencias, no existe una colocación perfecta de las dos proteínas (Fig. 26 A-D y video 19 del material suplementario ofrecido en CD). Observamos por tanto que, a pesar de existir regiones de colocación, detectadas en amarillo, este patrón no es uniforme, existiendo regiones donde no se detecta RAD21 (regiones con marcaje en rojo en la detección conjunta de la doble inmunolocalización) y regiones donde SMC3 parece estar ausente (regiones con marcaje en verde en la detección conjunta de la doble inmunolocalización). Esto se mantiene en diacinesis en el dominio intercromatídico (Fig. 26 E-H) y si comparamos las señales de SMC3 y RAD21 en metafase I el resultado aún mas evidente (Fig. 27 A-D). Además, en esta etapa de la meiosis distinguimos que el cromosoma X no presenta señal de RAD21 en su dominio intercromatídico (Fig. 27 A y E), frente a la señal de SMC3 que describe

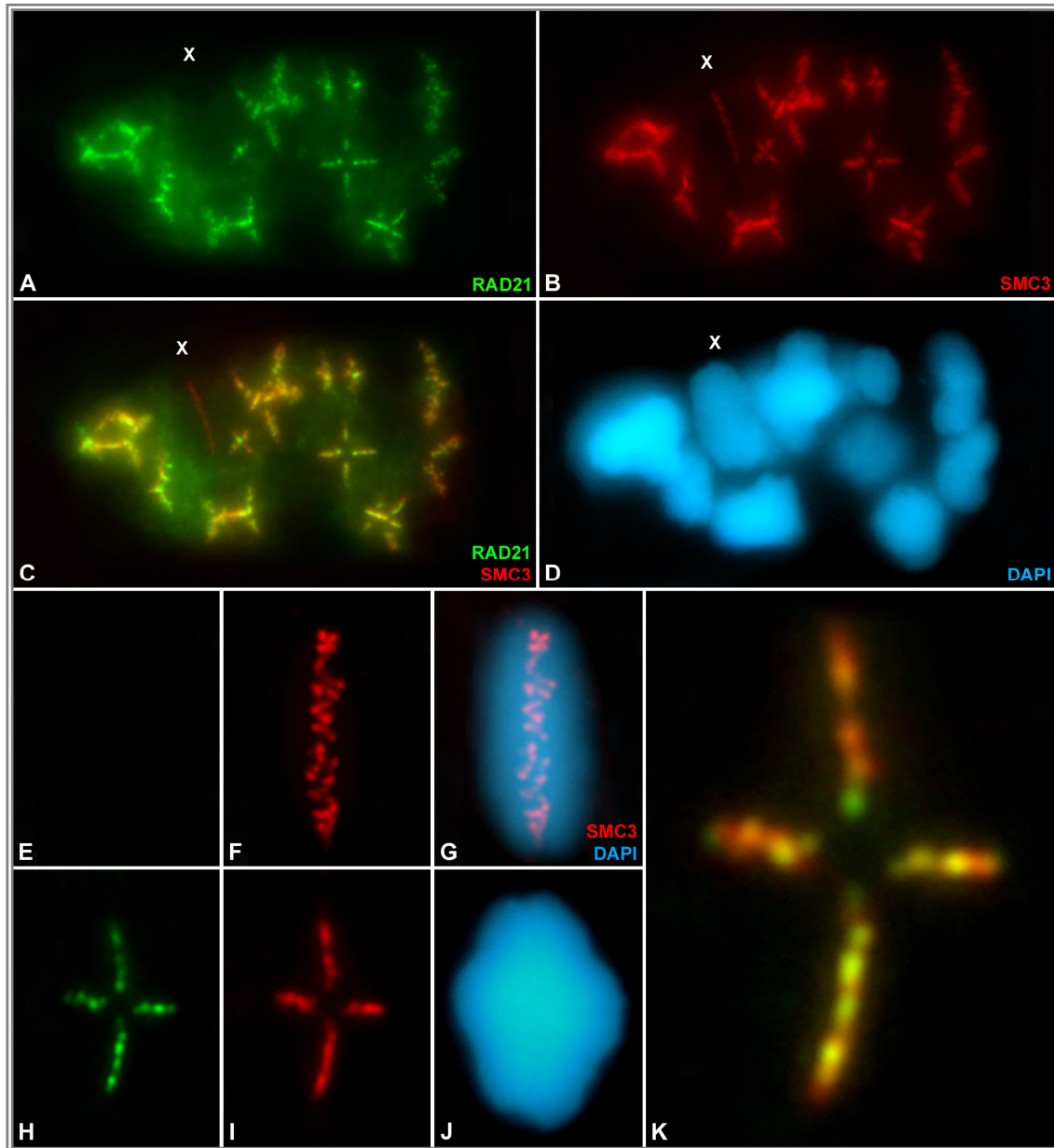
una trayectoria en zigzag entre ambas cromátidas hermanas del univalente sexual (Fig. 27 B y F).



**Figura 26. Doble inmunolocalización de RAD21 y SMC3 en *L. migratoria*: diplotena y diacinesis.** Todas las imágenes mostradas son la suma de distintos planos focales. (A-D) Diplotena temprana. (E-H) Diacinesis. El marcaje de RAD21 aparece en verde (A y E) y el de SMC3 en rojo (B y F). La cromatina se ha teñido con DAPI y aparece en azul (D y H). La superposición de RAD21 y SMC3 (C y G) muestra que la colocalización en estas etapas no es completa, detectándose parches verdes, rojos y amarillos.

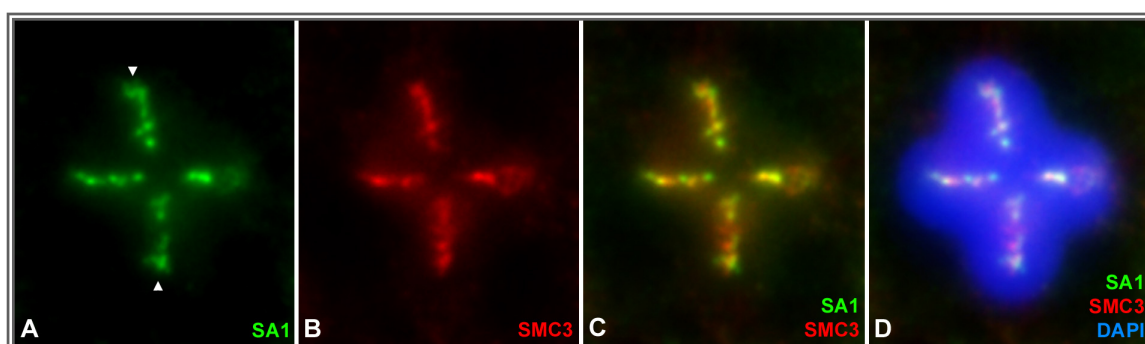
En metafase I, en los bivalentes autosómicos, se observa la presencia de RAD21 y de SMC3 en su dominio intercromatídico y la señal de ambas proteínas es interrumpida en el punto o puntos de quiasmas, no apreciándose acumulación de ninguna de las dos cohesinas en los centrómeros (Fig. 27 A, B, H e I). Cuando analizamos detalladamente la distribución de estas cohesinas de forma conjunta, se observa que el marcaje no presenta un patrón de colocalización uniforme (Fig. 27 C y K), distinguiéndose regiones a lo largo del dominio intercromatídico donde la proporción de RAD21 es mayor, frente al marcaje de SMC3 y viceversa. Este hecho da lugar a un patrón a parches, regiones donde sólo se detecta RAD21 (verdes), regiones con únicamente SMC3 (rojo) y regiones donde sí colocalizan (amarillo). Este resultado fue corroborado no sólo con el análisis detallado de la superposición de la señal de RAD21 y SMC3 en bivalentes con un quiasma intersticial, tomados con microscopía óptica de fluorescencia en un microscopio motorizado en el eje Z, como se muestra en

la figura 27, sino que además se realizaron reconstrucciones tridimensionales (Video 20 del material suplementario ofrecido en CD) y se utilizó microscopía confocal con escaneado secuencial para evitar la interacción de los fluorocromos (imagen no mostrada) en diferentes preparados de aplastados de testículos.



**Figura 27. Doble inmunolocalización de RAD21 y SMC3 en *L. migratoria*: metafase I.** RAD21 aparece en verde y SMC3 en rojo. La cromatina se muestra en azul teñida con DAPI. Todas las imágenes son la superposición de diferentes planos focales. (A-D) Metafase I. Tanto RAD21 (A) como SMC3 (B) se localizan en el dominio intercromatídico de los autosomas. En C se muestra la superposición de la señal de RAD21 y SMC3. El cromosoma X aparece marcado, detectándose señal de SMC3 (rojo) en su dominio intercromatídico pero no de RAD21. (E-G) Cromosoma X. No se detecta señal con RAD21 (E) mientras que con SMC3 (F) se observa un marcaje en zigzag en el dominio intercromatídico (F). (G) Superposición de la señal de SMC3 sobre el DAPI del cromosoma X. (H-K) Bivalente con quiasma intersticial. Tanto RAD21 (H) como SMC3 (I) se detectan en el dominio intercromatídico, pero la superposición de ambas señales (K) muestra un patrón a parches donde se alternan los puntos verdes, rojos y amarillos, denotando ausencia de colocalización completa

El resultado obtenido con la doble inmunolocalización de RAD21 y SMC3 se repite cuando analizamos conjuntamente a SA1 y SMC3. Ambas cohesinas muestra un patrón a parches en el dominio intercromatídico de los autosomas, observándose regiones donde sólo se detecta SA1, regiones donde la única cohesina detectada es SMC3 y regiones de colocalización. La única diferencia en este caso, con respecto a la doble inmunolocalización de RAD21 y SMC3, es que SA1 se acumula en los centrómeros en metafase I. Sin embargo, la intensa acumulación de SA1 en los centrómeros que se observa en la inmunolocalización simple, no se revela de igual forma en la doble detección con SMC3, observándose que SA1 está presente en los centrómeros pero con un patrón mucho más débil (Fig. 28).



**Figura 28.** Doble inmunolocalización de SA1 y SMC3 en un bivalente en metafase I de *E. plorans*. Bivalente con un quiasma intersticial seleccionado de una metafase I. SA1, en verde (A) y SMC3, en rojo (B) marcan el dominio intercromatídico. SA1 se acumula en los centrómeros (cabezas de flecha). La superposición de SA1 y SMC3 (C) muestra un patrón de no colocalización completa. La cromatina se ha teñido con DAPI y se muestra en azul sobre la superposición de las señales de SA1 y SMC3 (D).

### 3. Secuencia de la Recombinación y la Sinapsis.

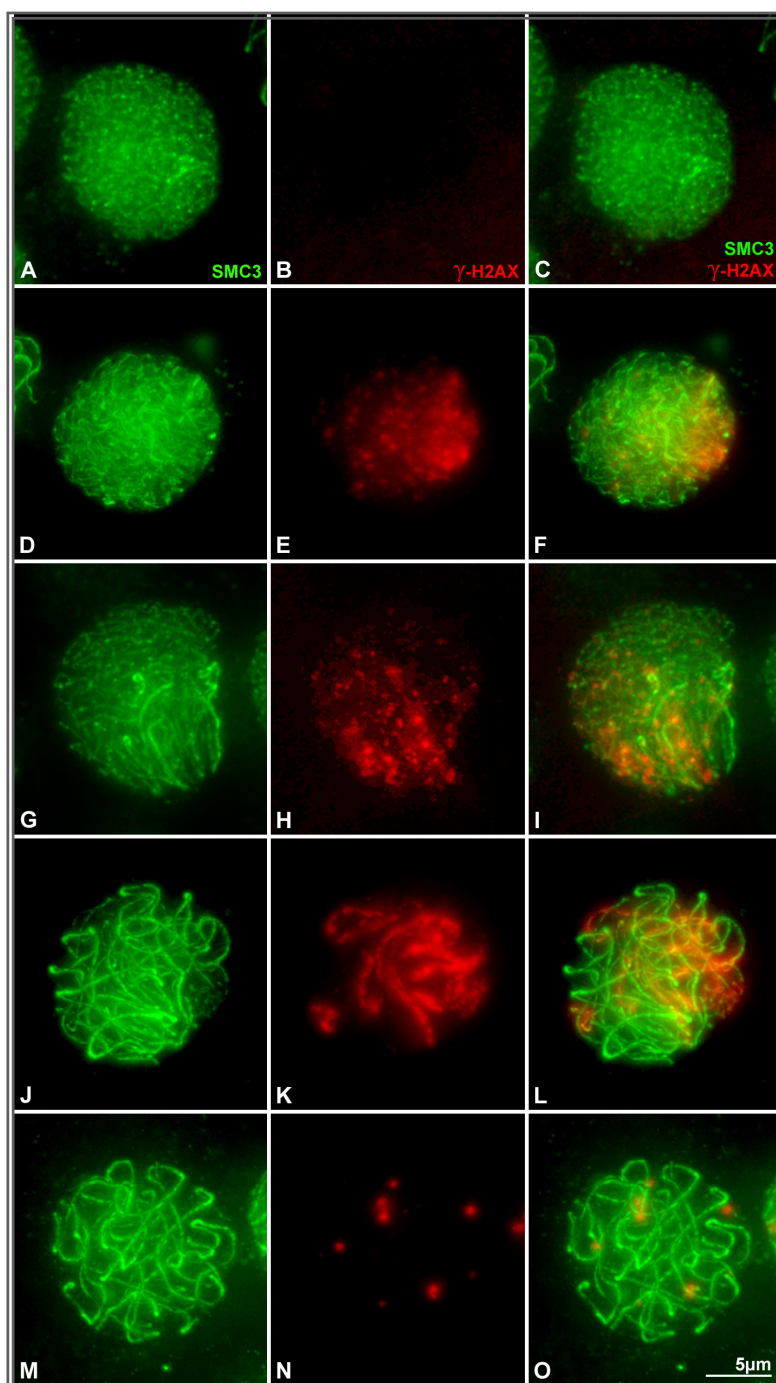
Las relaciones existentes entre los procesos de recombinación recíproca y la sinapsis es un tema que suscita gran interés dentro de los estudios de la meiosis. Al fin y al cabo, ambos eventos son clave en el desarrollo meiótico y exclusivos de este tipo de división celular. Con el objeto de analizar la distribución y el momento de aparición de las “DSB” en relación al progreso de la sinapsis en saltamontes, hemos analizado el marcaje de SMC3,  $\gamma$ -H2AX y RAD51 mediante dobles inmunolocalizaciones. La inmunolocalización de SMC3 nos permite conocer el progreso de la sinapsis, ya que la

localización de SMC3 durante la profase I en saltamontes , concuerda con la señal que esperaríamos del marcaje de la formación de los EA/EL del CS (Heyting, 1996). Por su parte, la inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX nos permite marcar las “DSB” meióticas de inicio de la recombinación (Mahadevaiah y col., 2001) y RAD51 es una recombinasa implicada en las primeras etapas de reparación de las “DSB” (Shinohara y col., 1992). Mediante el estudio de la localización, aparición y distribución de estas tres proteínas analizamos la relación temporal de la recombinación y la sinapsis.

### **3.1. El marcaje de $\gamma$ -H2AX precede a la sinapsis.**

La doble inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX y SMC3 en leptotena temprana muestra finos trazos de SMC3 homogéneamente formados en todo el núcleo pero no detectamos señal de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 29 A-C). Un poco más adelante en el proceso meiótico, en la transición de leptotena a cigotena, cuando se observan los primeros indicios de sinapsis mediante el marcaje de SMC3, se detectan las primeras señales de  $\gamma$ -H2AX, cuyo marcaje aparece como acumulaciones masivas precisamente en la región de inicio de sinapsis (Fig. 29 D-F). En cigotena los extremos de los filamentos se localizan juntos en un punto de la envoltura nuclear, dando lugar a la conocida organización en “bouquet”. Precisamente en esa región se distingue un marcaje masivo de  $\gamma$ -H2AX, el cual decae en aquellas regiones que han completado la sinapsis, pero persiste sobre las que todavía están por sinapsar según avanza la cigotena (Fig. 29 G-I). En cigotena tardía la señal de la histona fosforilada presenta una configuración en cordones, localizada principalmente sobre las regiones que aún no han completado la sinapsis, es decir, sobre los ejes finos de SMC3 (Fig. 29 J-L). En paquitena, una vez se ha completado la sinapsis, la señal de  $\gamma$ -H2AX queda reducida a unos pocos puntos sobre los ejes de cohesina (Fig. 29 M-O). Hemos contabilizado el número de puntos de  $\gamma$ -H2AX en 50 espermátocitos en paquitena media y el número de focos oscila entre 10 y 20. Una vez conocida la dinámica de aparición y desaparición de  $\gamma$ -H2AX relativa al progreso sináptico, podemos concluir que las “DSB” meióticas ocurren con anterioridad al inicio de la sinapsis.



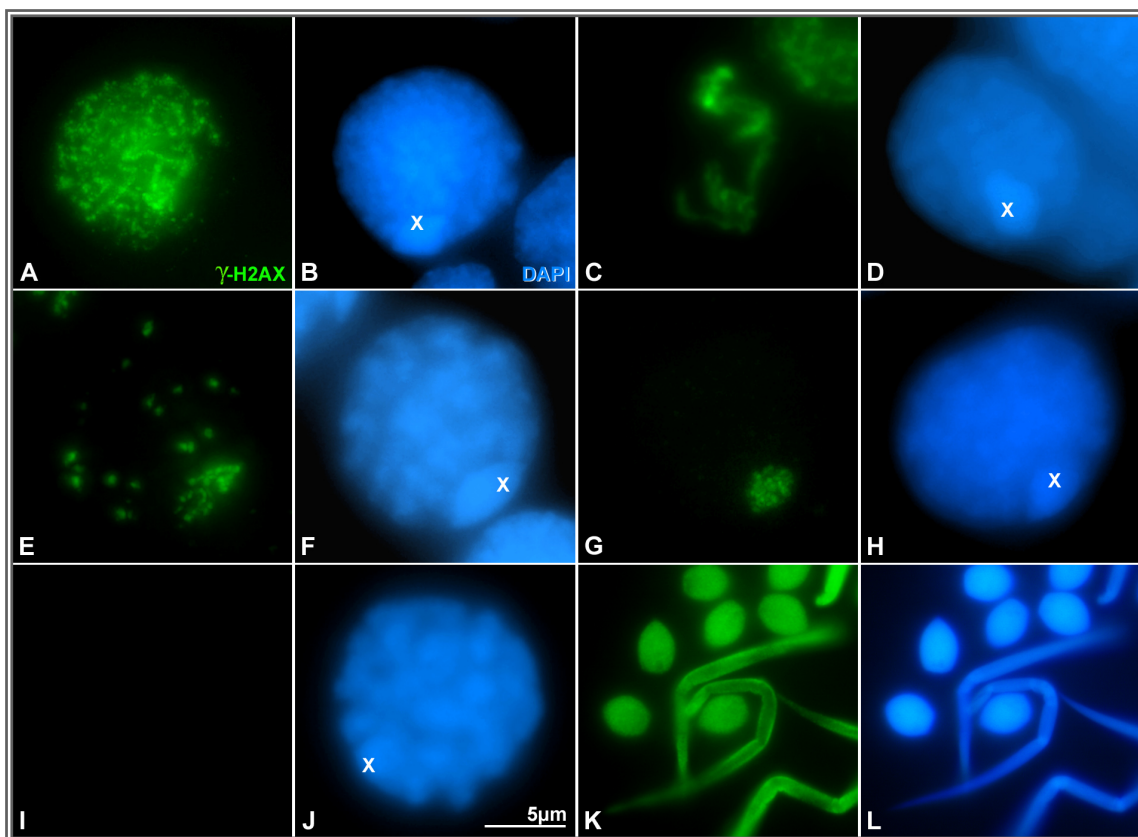


**Figura 29: Inmunolocalización doble de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX en *L. migratoria*: profase I.** La señal de SMC3 se muestra en verde en la primera columna y la de  $\gamma$ -H2AX en rojo en la segunda. En la tercera columna se observa la suma de las señales de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX. Todas las imágenes corresponden a la superposición de diferentes planos focales. (A-C) Leptotena temprana. No se detecta marcaje de  $\gamma$ -H2AX (B). (D-F) En leptotena tardía se observan grandes acumulaciones de  $\gamma$ -H2AX (E) principalmente en aquellas regiones donde comienza la sinapsis. (G-I) En cigotena media los focos de  $\gamma$ -H2AX (H) se localizan esencialmente en la región del "bouquet" (I). En cigotena tardía (J-L), el marcaje de  $\gamma$ -H2AX está restringido a aquellas regiones donde los ejes de SMC3 son finos (L). (M-O) En paquitena los focos de  $\gamma$ -H2AX (N) se localizan sobre los ejes de SMC3 de cromosomas sinapsados (O).

### 3.2. El cromosoma X presenta marcaje de $\gamma$ -H2AX hasta paquitena.

La doble inmunolocalización de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX, a pesar de ser de gran utilidad para identificar la secuencia en la relación de las "DSB" y la sinapsis, no nos permite observar un marcaje claro sobre la cromatina del cromosoma sexual. Este fenómeno quizá sea debido a una interacción entre ambos anticuerpos. Sin embargo, la inmunolocalización simple de  $\gamma$ -H2AX muestra que la cromatina del cromosoma X

aparece marcada en cigotena y paquitena (Fig. 30 A-H). Por lo tanto, observamos en cigotena temprana un cierto marcaje de  $\gamma$ -H2AX en la cromatina del cromosoma X y un marcaje masivo en los autosomas (Fig. 30 A y B). En cigotena media, la señal de la histona fosforilada se va reduciendo a las regiones de los autosomas que quedan por sinapsar, apareciendo la señal de  $\gamma$ -H2AX como cordones en la cromatina autosómica y marca intensamente el cromosoma sexual (Fig. 30 C y D). En paquitena temprana, el marcaje de  $\gamma$ -H2AX queda reducido a puntos en el núcleo y la señal que se observa sobre el cromosoma X recuerda a un cordón entrelazado sobre sí mismo (Fig. 30 E y F). En paquitena tardía, sólo se detecta  $\gamma$ -H2AX sobre el cromosoma X. (G y H) Paquitena tardía. Sólo se detecta  $\gamma$ -H2AX sobre el cromosoma X. (I y J) Diplotena temprana. No se detecta señal ni en la cromatina autosómica ni en el cromosoma sexual. (K y L) El núcleo de las espermatidas aparece intensamente marcado. La barra de medida en J no es aplicable a K y L.



**Figura 30. Inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX en *L. migratoria*: la señal del cromosoma X y las espermatidas.** El marcaje de  $\gamma$ -H2AX aparece en verde y la cromatina en azul. El cromosoma sexual está marcado en la cromatina. Todas las imágenes son la suma de varios planos focales. (A y B) Cigotena temprana. Se detecta un intenso marcaje en el núcleo, incluido el cromosoma X. (C y D) Cigotena media. Sobre la cromatina autosómica se detectan cordones de  $\gamma$ -H2AX y en el X. (E y F) Paquitena temprana. En la cromatina autosómica se detectan discretos focos de  $\gamma$ -H2AX. La cromatina del cromosoma X aparece teñida. (G y H) Paquitena tardía. Sólo se detecta  $\gamma$ -H2AX sobre el cromosoma X. (I y J) Diplotena temprana. No se detecta señal ni en la cromatina autosómica ni en el cromosoma sexual. (K y L) El núcleo de las espermatidas aparece intensamente marcado. La barra de medida en J no es aplicable a K y L.

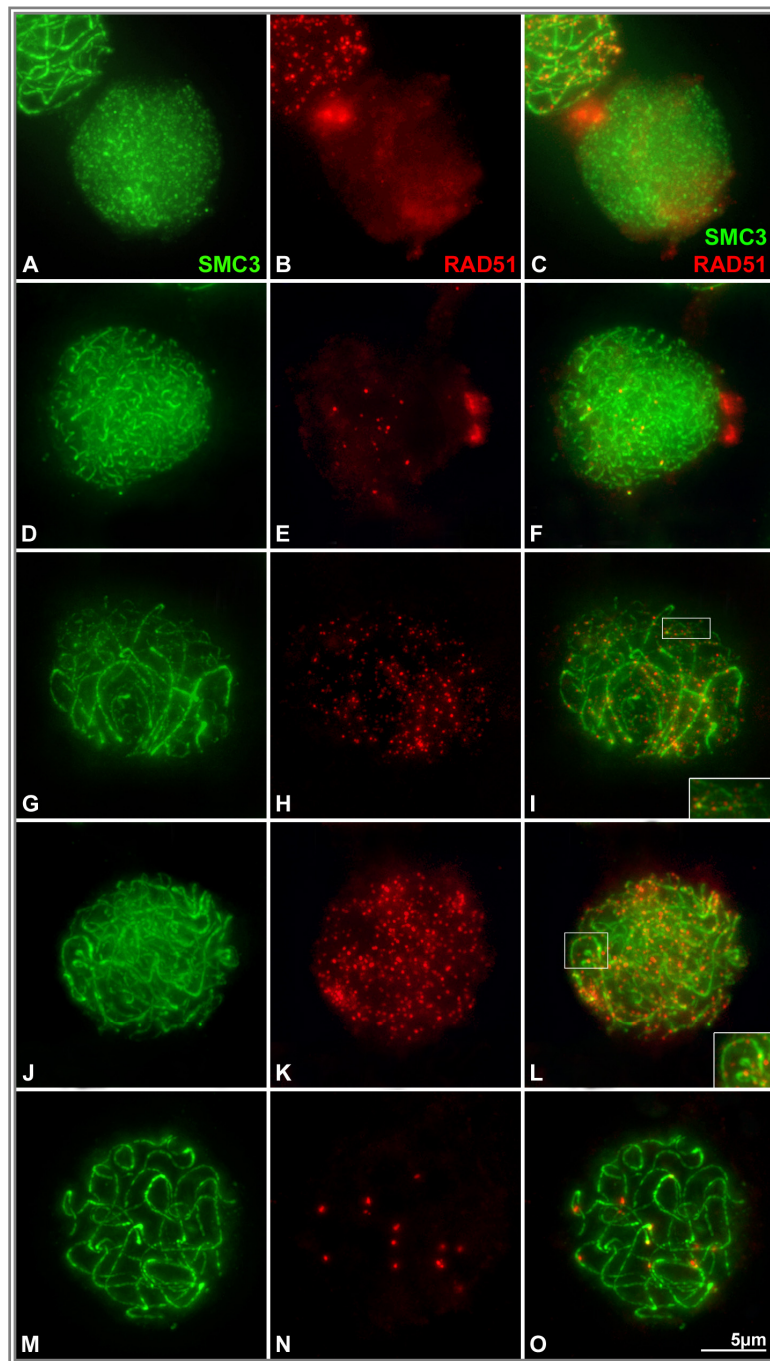
A partir de paquitena tardía la señal de  $\gamma$ -H2AX desaparece de los autosomas, quedando tan sólo marcado el cromosoma X (Fig. 30 G y H). En diplotena no se detecta

señal  $\gamma$ -H2AX ni en los autosomas, ni en el cromosoma sexual (Fig. 30 I y J) y no se observa señal en el resto de la división meiótica, asimismo no se detectó  $\gamma$ -H2AX en espermatogonias (imagen no mostrada). Sin embargo, las espermatídas muestran un intenso marcaje (Fig. 30 K). La localización de  $\gamma$ -H2AX en los núcleos de las espermatídas ha sido descrita también en ratón (Hamer y col., 2003).

### **3.3. RAD51 se localiza sobre el eje de cohesina con posterioridad a $\gamma$ -H2AX.**

La acumulación de factores de reparación, como es el caso de RAD51, se detecta en forma de focos, o de puntos alrededor de las “DSB”, siendo ellos mismos un marcador de los puntos de rotura (Wood y Chen, 2008). Los espermátocitos en leptotena temprano aparecen vacíos de señal de RAD51 (Fig. 31 A-C), no detectándose la recombinasa hasta leptotena tardía o cigotena muy temprana, donde aparecen discretos puntos de RAD51 localizados sobre los ejes de cohesina de los cromosomas (Fig. 31 D-F). Según avanza dicha etapa, el marcaje de RAD51 aumenta, llegando a observarse núcleos de espermátocitos en cigotena media y tardía completamente llenos de focos de RAD51 (Fig. 31 G-L). Los puntos de RAD51 se encuentran asociados tanto a los ejes de cohesina finos, correspondientes a regiones autosómicas sin sinapsar (Detalle en figura 31 I), como a los ejes de cohesina gruesos, regiones autosómicas sinapsadas. Una vez se ha completado la sinapsis, la señal de RAD51 decrece rápidamente, observándose en paquitena media un escaso número de focos de la recombinasa (Fig. 31 M-O). En paquitena tardía la señal de RAD51 se pierde completamente y no se vuelve a observar en ninguna etapa de la meiosis (imagen no mostrada). En ningún momento el marcaje de RAD51 se asocia al eje de cohesina del cromosoma X.

Todos estos datos apuntan a que el reclutamiento de RAD51 es posterior al marcaje de  $\gamma$ -H2AX. A pesar de que ambas proteínas parecen detectarse en etapas similares, la detección masiva de  $\gamma$ -H2AX en la transición leptotena-cigotena donde aparece RAD51 discretamente, hace pensar en que las “DSB” detectadas por  $\gamma$ -H2AX acontecen con ligera anterioridad a la presencia de RAD51.

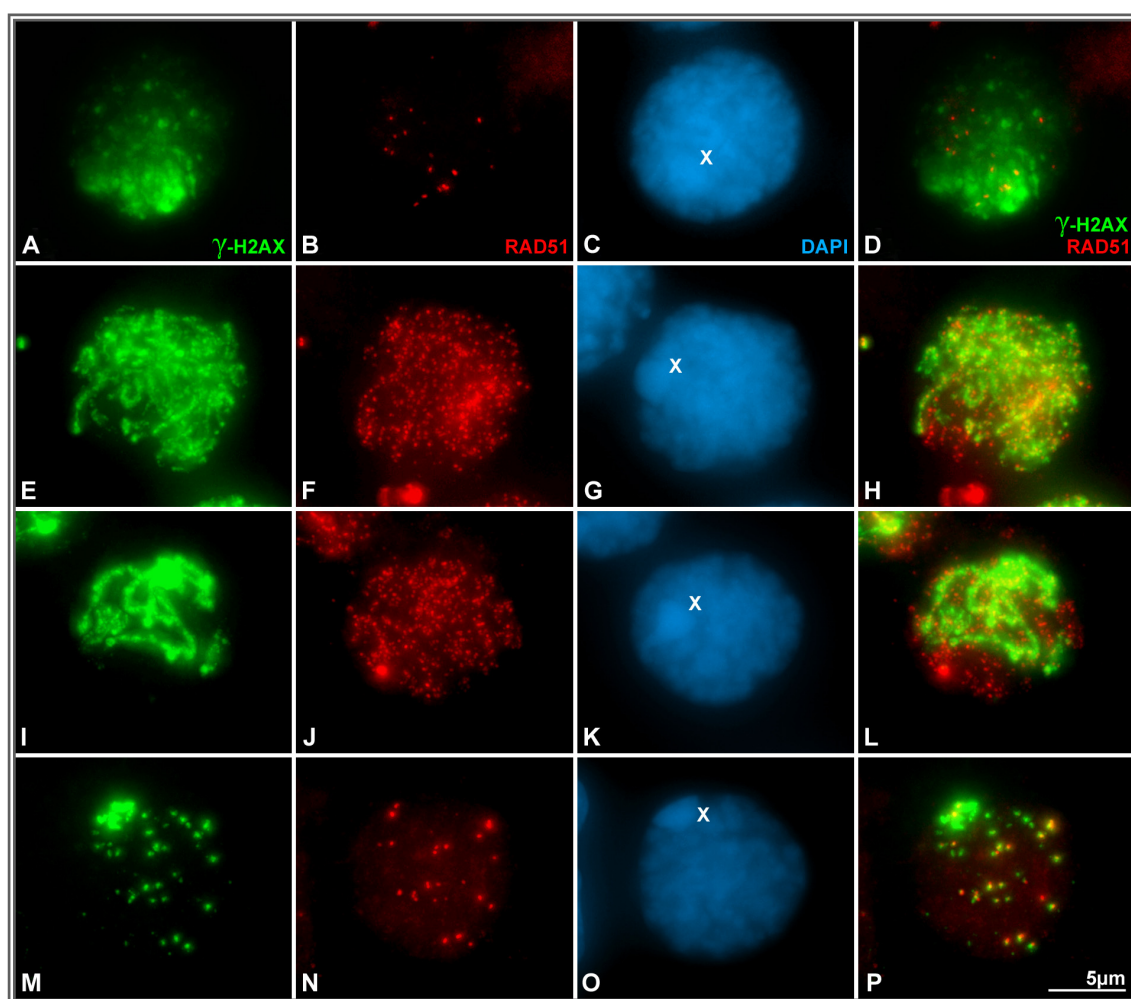


**Figura 31. Doble inmunodetección de SMC3 y RAD51 en *L. migratoria*: profase I.** La señal de SMC3 se detecta en verde y la de RAD51 en rojo. La superposición de las señales de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX se observa en la tercera columna. Todas las imágenes son la suma de diferentes planos focales. (A-C) En leptotena temprana no se detecta señal de RAD51. (D-F) En leptotena tardía se observan focos de RAD51 localizados sobre los ejes de cohesina. (G-L) En cigotena hay un incremento en la señal de RAD51, observándose tanto en cigotena medio (G-I) como en cigotena tardía (J-L) un aumento del número de focos de RAD51 respecto a etapas anteriores. La señal de RAD51 se localiza sobre los ejes de cohesina tanto en regiones donde no se ha completado la sinapsis (detalle recuadrado en I), como en regiones sinapsadas (detalle recuadrado en L). (M-O) Paquitena con discretos puntos de RAD51 sobre los ejes sinapsados de los autosomas (O).

Para comprobar si realmente el marcaje de  $\gamma$ -H2AX es anterior al de RAD51, realizamos una doble inmunolocalización de ambas proteínas (Fig. 32). En etapas de leptotena temprana se observan marcaje de  $\gamma$ -H2AX sobre la cromatina autosómica pero no apreciamos señal de RAD51. En leptotena tardía se distingue un marcaje masivo de  $\gamma$ -H2AX pero la cantidad de puntos de RAD51 es muy discreta o nula (Fig. 32 A-D). En cigotena temprana (Fig. 32 E-H) se observa un amplio marcaje de ambas proteínas (Fig. 32 E). En esta etapa RAD51 esta presente en forma de focos distribuidos prácticamente

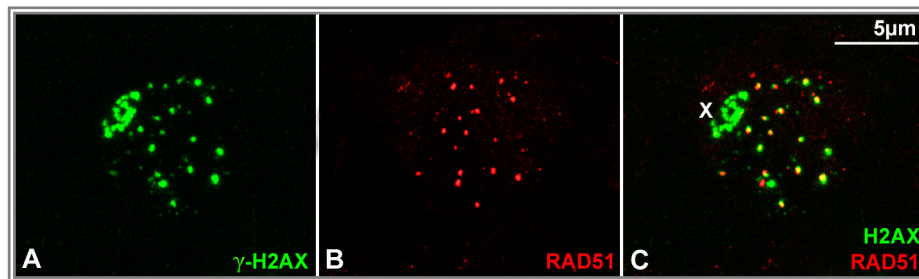


en todo el volumen nuclear, con excepción del cromosoma X (Fig. 32 F). En cigotena media  $\gamma$ -H2AX queda en forma de cordones en determinadas regiones nucleares, probablemente sobre regiones autonómicas que aún no han completado la sinapsis, además de observarse un intenso marcaje en el X. Sin embargo, RAD51 aparece en todo el núcleo, excepto sobre el cromosoma sexual (Fig. 32 I-L). En paquitena temprana hay una correspondencia entre el número de focos de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 (Fig. 32 M-O). Sin embargo, aunque están muy próximos, no colocalizan estrictamente.



**Figura 32. Doble inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX (verde) y RAD51 (rojo) en *L. migratoria*; profase I.** La cromatina está teñida con DAPI en azul. El cromosoma X está marcado sobre el DAPI. Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. (A-D) Leptotena tardía. Se observa un marcaje masivo de  $\gamma$ -H2AX y un reducido número de focos de RAD51. (E-L) En cigotena, temprana (E-H) y media (I-L), el marcaje con ambos anticuerpos aumenta. La señal de  $\gamma$ -H2AX (E y I) se detecta como cordones. Se observan focos de RAD51 en por todo el núcleo (F y J). (M-P) En paquitena temprana, la señal de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 queda reducida a unos pocos focos con una distribución parecida en el núcleo. El cromosoma X presenta marcaje de  $\gamma$ -H2AX desde leptotena hasta paquitena, sin embargo en ninguna etapa se observa señal de RAD51 sobre la cromatina sexual. En determinadas figuras parece existir focos de RAD51 sobre la cromatina del cromosoma X (H, L), pero esto es un artefacto debido a la superposición de los planos focales tomados de cada núcleo.

Sobre el cromosoma X no se observó en ninguna etapa meiótica señal de RAD51, a pesar de que su cromatina aparece marcada con  $\gamma$ -H2AX desde leptotena hasta paquitena. El análisis con microscopía confocal así lo confirma (Fig. 33 B y C). Si en alguna de las imágenes de la figura 32 da la sensación de que existen puntos de RAD51 sobre el X, es debido a la suma de los planos focales que componen la totalidad del volumen nuclear.



**Figura 33. Paquitena de *L. migratoria* tomada con microscopia confocal.** Inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51.  $\gamma$ -H2AX se distingue en verde y RAD51 en rojo. La cantidad de focos de  $\gamma$ -H2AX y RAD51 es muy parecida y la proximidad de los mismos es evidente, pero en el análisis confocal y tras la superposición de ambas señales, se observa que no colocalizan (C). Además se observa la total ausencia de focos de RAD51 en el cromosoma X.

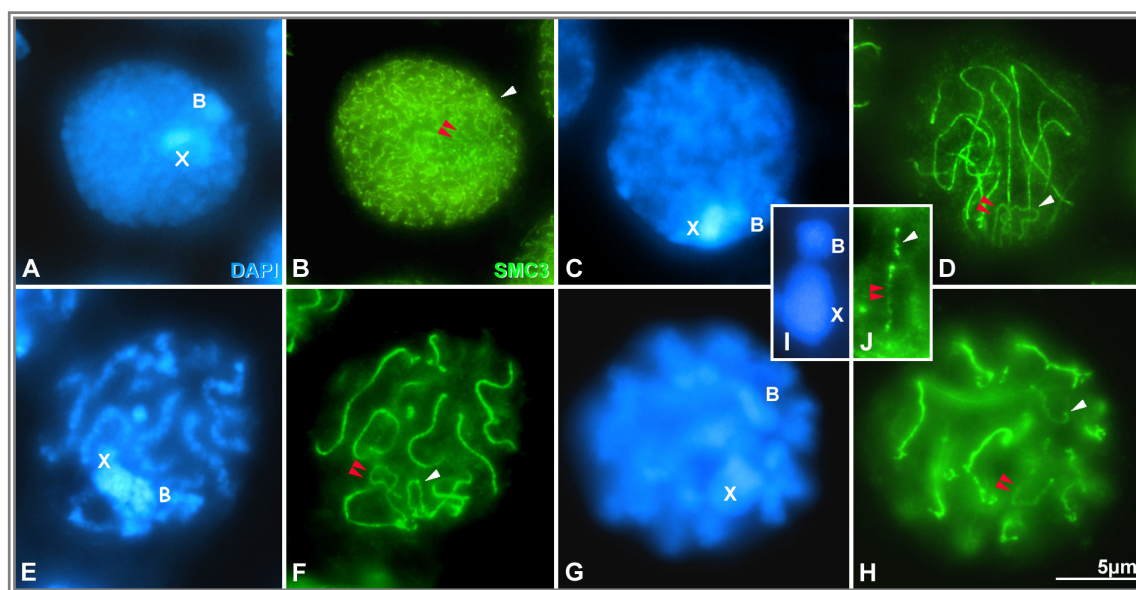
#### 4. Univalentes en *E. plorans*.

Algunos individuos de la especie *E. plorans* presentan lo que se conoce como cromosomas B o accesorios. Este tipo de cromosomas son adicionales y dispensables al complemento A de la especie y a pesar de que siguen su propia vía de evolución, muchos estudios los relacionan directamente con los cromosomas sexuales (Amos y Dover, 1981; Jones y Rees, 1982; Jones, 1995; Camacho y col., 2000). En este contexto, hemos estudiado diferentes individuos machos portadores de un cromosoma B y hemos comparado los resultados con los datos del cromosoma sexual en machos. De esta manera hemos comparado el ciclo de la cromatina, la estructura, el marcaje de distintas cohesinas y de proteínas relacionadas con recombinación, en dos univalentes naturales que coexisten en un mismo ambiente celular y que no forman un bivalente entre sí, ni con otro cromosoma del complemento.

##### 4.1. Cromatina y distribución de la cohesina SMC3.

En saltamontes, durante la profase I, podemos identificar el cromosoma X en aplastados de espermatocitos teñidos con DAPI porque presenta una heteropiconosidad

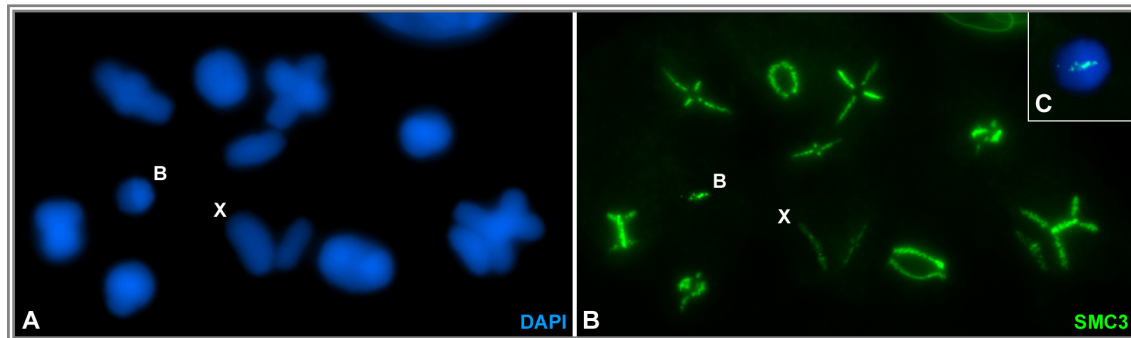
positiva y suele localizarse en la periferia nuclear. El cromosoma B muestra aspecto de la cromatina similar al univalente sexual, distinguiéndose ambos univalentes de los autosomas (Fig. 34). Estas observaciones podrían mostrar una condensación diferencial de su cromatina con respecto a la de los bivalentes autosómicos. Para el estudio durante la profase I se seleccionaron aquellos espermatoцитos donde el cromosoma X y el B aparecen separados o son fácilmente distinguibles el uno del otro.



**Figura 34. Inmunolocalización de SMC3 en un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B: profase I.** La cromatina se distingue en azul por la tinción con DAPI y el marcaje de SMC3 en verde. La posición de los univalentes X y B se indica mediante cabezas de flechas rojas y blancas respectivamente. Todas las imágenes son la suma de diferentes planos focales. (A y B) Leptotena. El cromosoma X y el B presentan filamentos lineales de SMC3, igual a los que están distribuidos por el resto del núcleo. (C y D) En cigotena y (E y F) paquítena, se detecta un eje fino de SMC3 en el cromosoma X y el B. En paquítena el grosor del eje de SMC3 del cromosoma B es ligeramente más grueso que el del cromosoma sexual (F). (G y H) En diplotena los autosomas presentan excrescencias en su eje de SMC3, mientras que el marcaje de los ejes en los univalentes se detecta más uniforme. (I y J) Detalle del cromosoma X y el B en diacinesis con señal lineal de SMC3 en el dominio intercromatídico de ambos univalentes.

Tras la inmunolocalización de SMC3, en leptotena se distinguen discretos y cortos fragmentos lineales en el cromosoma X y en el B (Fig. 34 A y B). En cigotena los cromosomas X y B presentan un eje de cohesina fino. Generalmente encontramos a ambos univalentes polarizados en la misma región nuclear donde se configura el “bouquet” (Fig. 34 C y D). En paquítena, mientras los ejes de SMC3 en la cromatina autosómica son todos gruesos, en los univalentes distinguimos un eje de cohesina de aproximadamente la mitad de grosor (Fig. 34 E y F y video 21 del material suplementario ofrecido en CD). Continuando con el progreso de la meiosis, en diplotena se observaban las excrescencias características de esta etapa en el eje de cohesina de los

autosomas, pero el eje de SMC3 de los dos univalentes muestra un aspecto más lineal, sin excrecencias tan evidentes (Fig. 34 G y H). En diacinesis, la cohesina SMC3 se localiza en el dominio intercromatídico de los univalentes (Fig. 34 I y J). En metafase I, la apariencia de la cromatina del X y del B es ligeramente diferente a la de los bivalentes autosómicos, presentando un aspecto más granuloso, con los bordes menos definidos, frente a la intensidad y nitidez de señal que se aprecia en los autosomas (Fig. 35 A).



**Figura 35. Inmunolocalización de SMC3 en un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B: metafase I** Las imágenes son el resultado de la suma de los distintos planos focales. La cromatina se tiñó con DAPI (azul, en A y C) y la inmunodetección de la subunidad de cohesina SMC3 se reveló en verde (B y C). El cromosoma X y el B aparecen marcados. (A) La tinción con DAPI muestra un bloque proximal heteropícnico positivo en el cromosoma B. (B y C) La subunidad SMC3 se detecta en el dominio intercromatídico de todos los cromosomas, bivalentes y univalentes.

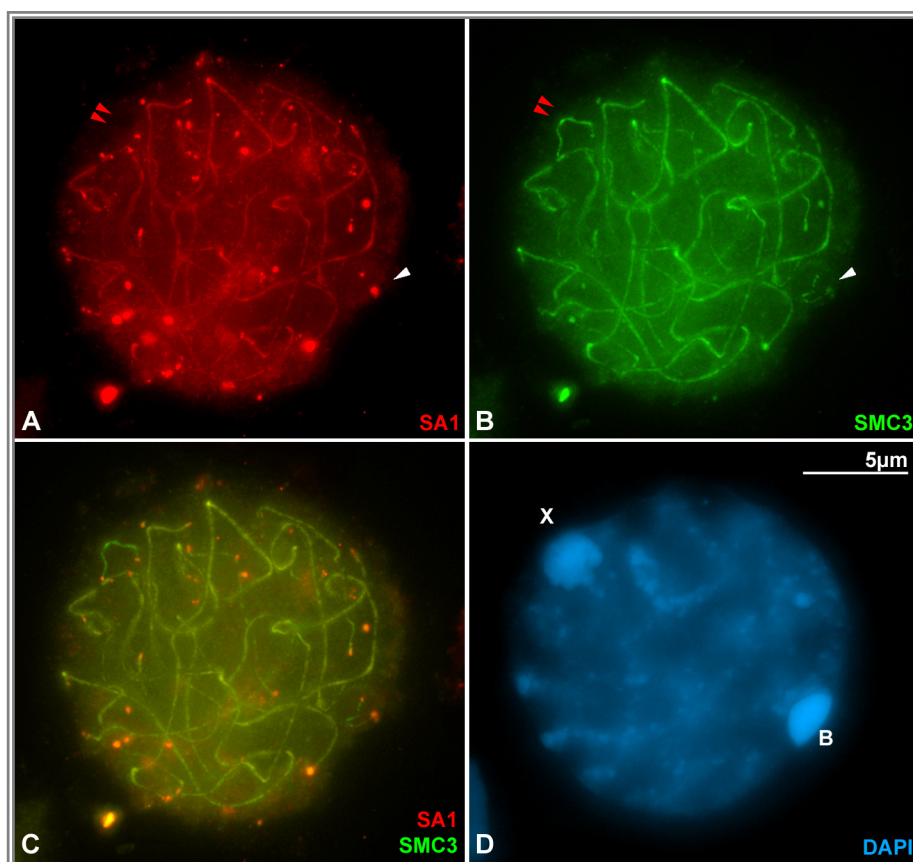
En el cromosoma B además distinguimos que la región proximal es heteropícnica positiva a la tinción con DAPI. Por las poblaciones naturales seleccionadas, presumiblemente los cromosomas B analizados sean del tipo B1 y B24, por lo tanto esa heteropícnosidad positiva que presentan en el extremo centromérico en metafase I pueda ser debida a la presencia de ADN repetido de 180bp en la región paracentromérica (Cabrero y col., 1999). La inmunolocalización de SMC3, revela que ésta cohesina está presente en el dominio intercromatídico de ambos univalentes (Fig. 35 B).

#### **4.2. Distribución de SA1.**

Probablemente una de las características más destacables del cromosoma X en profase I es que no muestra eje de cohesina tras la inmunolocalización de SA1, pero sí de SMC3. Para comprobar si este patrón se repetía en los cromosomas accesorios, realizamos una doble inmunolocalización de ambas cohesinas y comprobamos en



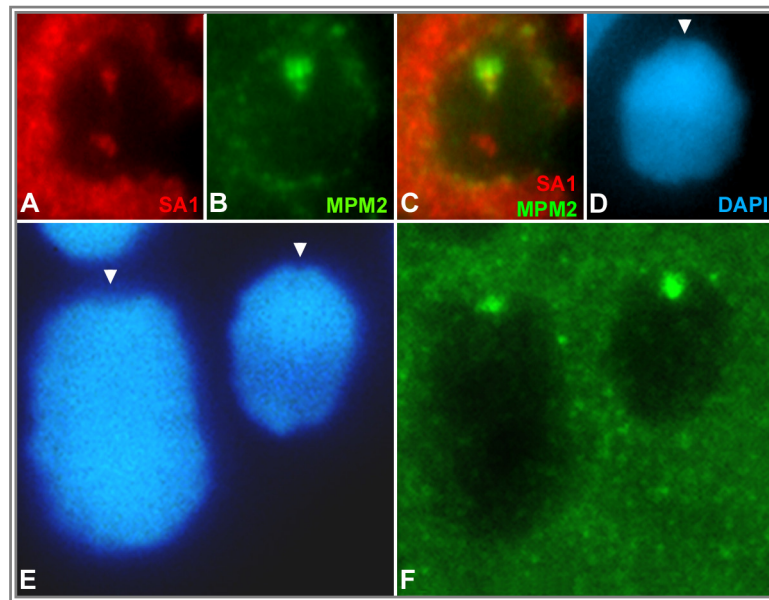
paquitena que tanto el cromosoma X como el B carecen de señal lineal de SA1 en su cromatina (Fig. 36 A), frente al eje simple de SMC3 presente en ambos univalentes (Fig. 36 B).



**Figura 36. Doble inmunodetección de SA1 y SMC3 en un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B: detalle en paquitena.** La señal de SA1 se detecta en rojo (A) y la de SMC3 en verde (B). En C se observa la superposición de ambas señales. La cromatina aparece teñida con DAPI en azul (D). Todas las imágenes son la suma de distintos planos focales. El cromosoma X (X y doble cabeza de flecha roja) y el B (B y cabeza de flecha blanca) aparecen señalados. (A-C) SA1 y SMC3 se detectan como filamentos en la cromatina autosómica, los cuales colocan a lo largo de su recorrido. SA1 se acumula en los extremos de dichos filamentos. Nótese la ausencia de señal de SA1 en el dominio intercromatídico tanto en el cromosoma X como en el B, sin embargo, en la superposición de ambas señales es posible detectar una acumulación de SA1 en los extremos de los ejes de cohesina de ambos cromosomas.

En la visualización de las dos cohesinas a la vez, corroboramos no sólo que ambos marcajes colocan en los autosomas (Fig. 36 C), sino que la señal de SA1 en los extremos de sus ejes de cohesina se engrosa (Fig. 36 A y C), lo que correspondería a las placas de asociación. Adicionalmente observamos que tanto el X como el B muestran una señal en forma de punto en los extremos de su eje de SMC3, pudiendo ser el centrómero y el telocoro (Fig. 36 C). Al analizar la localización de SA1 en metafase I, observamos que al igual que ocurre en el X (revisar Fig. 18), esta cohesina marca un punto en cada extremo del cromosoma B (Fig. 37 A) y mediante la doble

immunolocalización con MPM2 nos dimos cuenta de que uno de ellos correspondía a la localización del centrómero (Fig. 37 B y C). Lo que implica que el punto del otro extremo debe ser el telócoro. Al igual que en el X, en el cromosoma B no hemos detectado ni SA1 ni MPM2 en el dominio intercromatídico (Fig. 37).

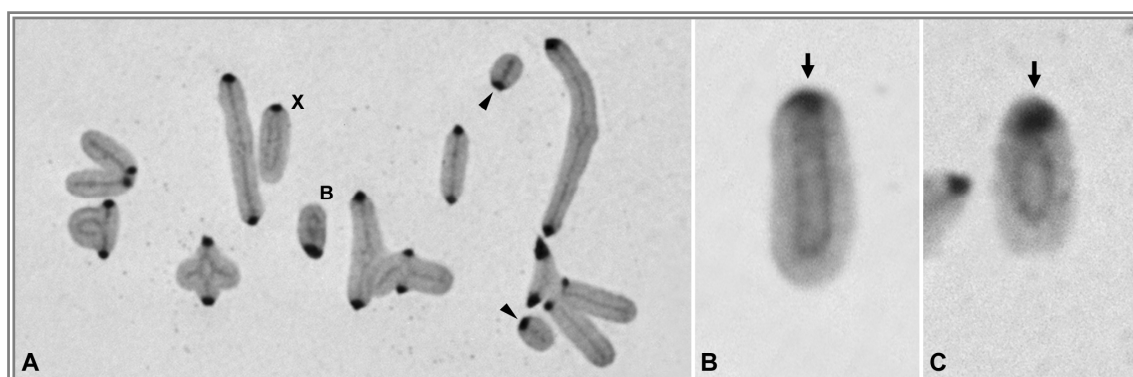


**Figura 37. Immunolocalización de SA1 y MPM2 en un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B: detalle en metafase I.** Todas las imágenes son la suma de varios planos focales. (A-D) Selección de un cromosoma B en metafase I tras la doble inmunolocalización de SA1, en rojo (A), y MPM2, en verde (B). (E y F) Detalle de un cromosoma X y un univalente B en metafase I tras la inmunodetección con MPM2. (D y E) La cromatina aparece teñida en azul con DAPI. La posición de los centrómeros se indica con cabezas de flecha blancas. (A) SA1 se detecta como un punto en el centrómero y otro en el telócoro, frente a MPM2 (B) que sólo marca el centrómero, tanto en el B como en el X (F). (D y E) La tinción con DAPI muestra un bloque heteropicnótico positivo en el cromosoma B que corresponde al bloque de heterocromatina proximal característico de éste tipo cromosómico.

#### **4.3. La estructura del X y el B coinciden en metafase I.**

La tinción con plata revela el eje proteico, compuesto por proteínas no histónicas, sobre el que se anclan los bucles de cromatina (“*scaffold*”) (Earnshaw y Laemmli, 1984) y se ha observado que en saltamontes además marca intensamente los cinetocoros (Suja y Rufas, 1994). En metafase I hemos observado que todos los bivalentes muestran dos estructuras altamente teñidas con aspecto redondeado orientadas a polos opuestos de la célula, los cinetocoros hermanos íntimamente asociados (Fig. 38 A). Asimismo, esta tinción revela una estructura lineal que recorre los bivalentes de un extremo a otro, abriéndose en la región del quiasma, representando por tanto el “*scaffold*” meiótico. Cada una de esas líneas corresponde a los dos ejes cromatídicos, íntimamente asociados en toda la longitud del bivalente excepto en el punto de quiasma. En el cromosoma X y

en el B distinguimos los que los ejes cromatídicos están abiertos, individualizados en su recorrido por las cromátidas pero unidos en los extremos centromérico y telomérico (Fig. 38 A, B y C). De manera ocasional, a veces se encuentran univalentes autosómicos, este hecho es muy escaso y puede estar causado por fallos en la recombinación. Sin embargo, hemos comprobado que sus ejes cromatídicos están íntimamente asociados en todo su recorrido, tal y como ocurre en los bivalentes (Fig. 38 A).



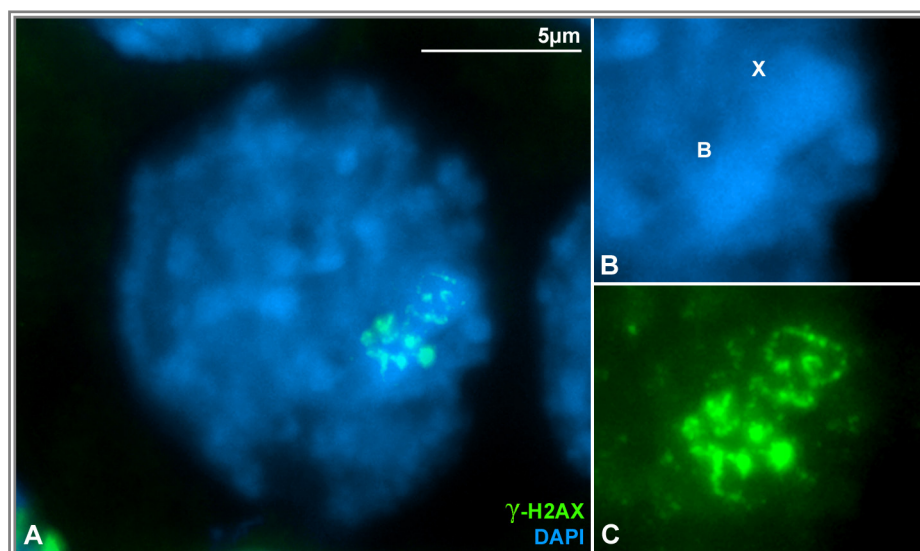
**Figura 38. Impregnación argéntica en aplastados de espermatocitos de un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B: metafase I.** (A) Metafase I completa. El cromosoma X y el B están indicados. Se observan 10 bivalentes y dos univalentes autosómicos (cabezas de flecha negras). Las acumulaciones en los extremos corresponden a los centrómeros. Los ejes cromosómicos revelados con esta tinción, líneas oscuras en el interior de los cromosomas, ocupan una posición central en los bivalentes, abriéndose en el quiasma, así como en los univalentes autosómicos.. (B) Detalle del cromosoma X donde se aprecia el centrómero intensamente teñido (flecha negra) y los ejes cromosómicos abiertos unidos en la región centromérica y cerca del extremo distal. (C) Detalle de un cromosoma B con la misma estructura que el cromosoma X.

#### **4.4. $\gamma$ -H2AX y RAD51 en el X y en el B.**

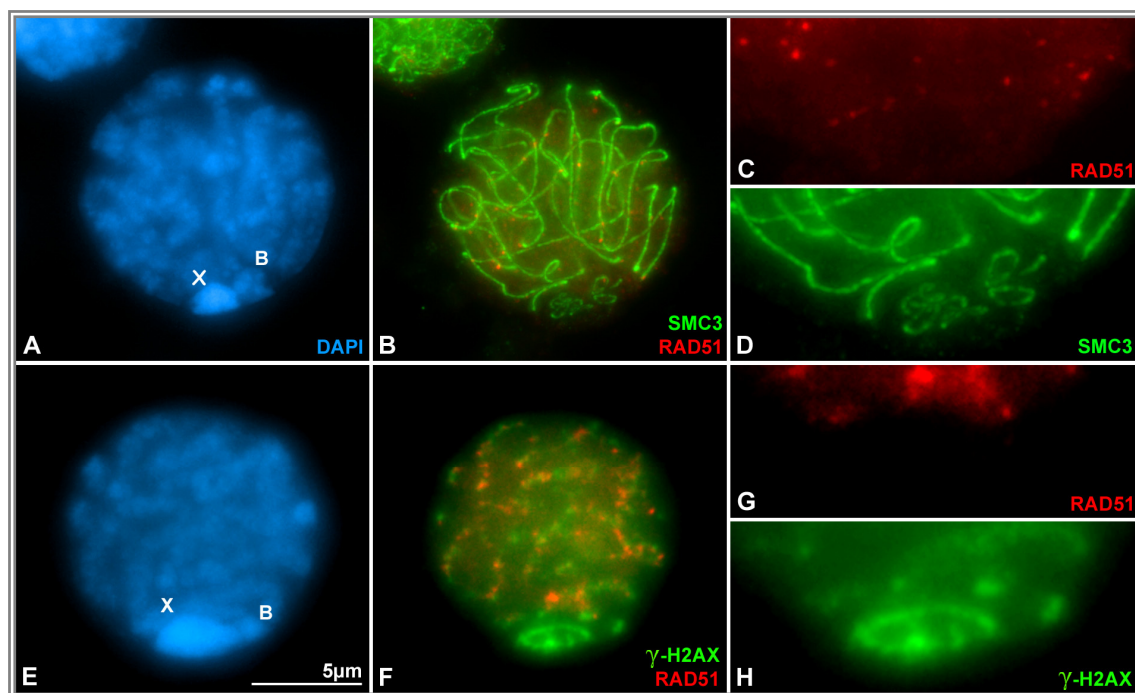
La morfología de la cromatina teñida con DAPI y la inmunolocalización de SMC3, nos permite identificar la etapa meiótica de cada espermatocito. Asimismo, ya hemos descrito el patrón de distribución de  $\gamma$ -H2AX y RAD51, lo que nos ayudará en esa identificación de la etapa meiótica para poder analizar el marcaje de  $\gamma$ -H2AX en el univalente B a lo largo de la profase I. Al igual que en el X, la señal de  $\gamma$ -H2AX en el cromosoma B se detecta intensamente sobre toda su cromatina desde cigotena temprana hasta paquitena tardía, incluso cuando ya no se distingue señal en los autosomas. La señal de la histona modificada en los univalentes adquiere una conformación de intensos cordones en su cromatina (Fig. 39 A-C). Por otro lado, en los autosomas, la mayor cantidad de focos de RAD51 se detecta en etapas de cigotena media, asociados a los ejes de cohesina, pero no se observa ningún punto sobre el eje del cromosoma X

(revisar Fig. 33). Lo mismo ocurre en paquitena temprano, aunque el número de focos de RAD51 desciende drásticamente en esta etapa de la meiosis, todavía se observan algunos puntos sobre los autosomas completamente sinapsados (Fig. 40 A-D). De nuevo en esta etapa no se observa señal de RAD51 sobre el cromosoma X (Fig. 40 E-G). Sin embargo, encontramos que la situación en el cromosoma B es ligeramente distinta. De forma esporádica observamos algún foco de RAD51 sobre la cromatina del cromosoma B (Fig. 40 B), pero no se encuentran directamente sobre su eje de cohesina y nunca encontramos más de uno o dos puntos.

Todos los datos analizados en esta memoria relativos a la apariencia de la cromatina, la distribución de las cohesinas, de  $\gamma$ -H2AX y RAD51 y la estructura cromosómica presentada por los cromosomas X y B, muestran una similitud entre ambos univalentes naturales que además los diferencia de los autosomas.



**Figura 39. Inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX en un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B: paquitena.** Todas las imágenes son la suma de diferentes planos focales. El cromosoma X y el B se identifican en la cromatina por ser heteropicnóticos positivos con DAPI (azul). La inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX (verde) muestra marcada tanto la cromatina del cromosoma B como del univalente sexual (X) en forma de cordón irregular. (B y C) Detalle del cromosoma X y el B con el marcaje de  $\gamma$ -H2AX y la cromatina por separado.



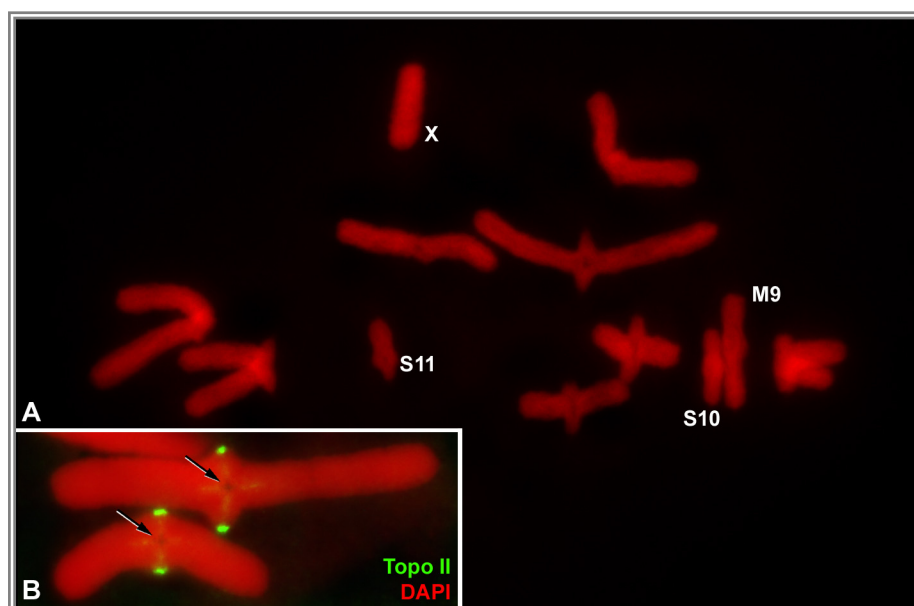
**Figura 40. Inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX, RAD51 y SMC3 en un macho de *E. plorans* portador de un cromosoma B.** Todas las imágenes son la suma de varios planos focales. La cromatina aparece en azul teñida con DAPI. El cromosoma X y el B se identifican en la cromatina por ser heteropícnóticos positivos (X y B). (A-D) Doble inmunolocalización de RAD51 (rojo) y SMC3 (verde) en paquítena temprana. Distinguimos los ejes de cohesina del cromosoma X y del B (B y D) pero no hay ningún foco de RAD51 sobre ellos (B y C). (E-H) Doble inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX (verde) y RAD51 (rojo) en cigotena media. El cromosoma X y el B muestran marcaje de  $\gamma$ -H2AX, pero no detectamos señal de RAD51 sobre su cromatina.

## *Análisis de la Meiosis en una especie con Sinapsis incompleta y localización de Quiasmas.*

### **5. El complemento cromosómico de los machos de S. grossum.**

Los machos de la especie *S. grossum* presentan un único cromosoma sexual y 11 bivalentes autosómicos, los cuales se han clasificado según su tamaño en tres grupos: grupo L que incluye a los tres cromosomas más largos (L1, L2 y L3), grupo M donde se encuentran los 6 cromosomas medianos (M4, M5, M6, M7, M8 y M9) y el grupo S representado por los dos cromosomas más pequeños del complemento (S10 y S11) (Shaw, 1970). Al igual que ocurría con las dos especies analizadas en el bloque anterior, todos sus cromosomas son telocéntricos. Sin embargo, los machos de esta especie presentan dos características que hacen especialmente relevante el estudio de su meiosis. Por un lado, el análisis de su patrón sináptico muestra que tres de sus bivalentes, los tres más pequeños (M9, S10 y S11), presentan sinapsis completa, pero en el resto la sinapsis se restringe a la región proximal (Jones y Wallace, 1980). Todos los bivalentes, excepto el M9, presentan un único quiasma, el cual está localizado siempre en la región proximal en los ocho bivalentes más largos del complemento (L1-M8). El bivalente M9 a veces exhibe dos quiasmas y cuando tan sólo tiene uno, éste está localizado en posición intersticial o distal (Jones, 1971). Mediante tinción con feulgen pudimos comprobar que los resultados relativos a la localización y número de quiasmas pueden aplicarse a la población natural analizada en nuestro laboratorio (Fig. 41). Por el tamaño de los bivalentes identificamos el S11, S10 y M9, los cuales tienen un quiasma, en este caso en posición distal y los 8 restantes presentan un quiasma siempre con localización proximal. La inmunolocalización de la proteína Topoisomerasa IIa marca los centrómeros, comprobando por tanto la localización proximal de los quiasmas en los bivalentes largos (L1-M8) (Fig. 41 B).





**Figura 41. Metafase I de *S. grossum*.** (A) Tinción con feulgen. Imagen tomada con microscopía de fluorescencia. Se observan 11 bivalentes y el cromosoma X. El cromosoma sexual y los bivalentes M9, S10 y S11 están señalados. Todos los bivalentes presentan un quiasma. (B) Inmunolocalización de ADN Topoisomerasa II (Topo II) en verde, la cual marca los centrómeros y ligeramente el dominio intercromatídico. La cromatina está teñida con DAPI y pseudocolorada en rojo. Detalle de dos bivalentes tipo L1-M8 con un quiasma proximal (flecha).

## 6. Análisis de las Cohesinas en *S. grossum*.

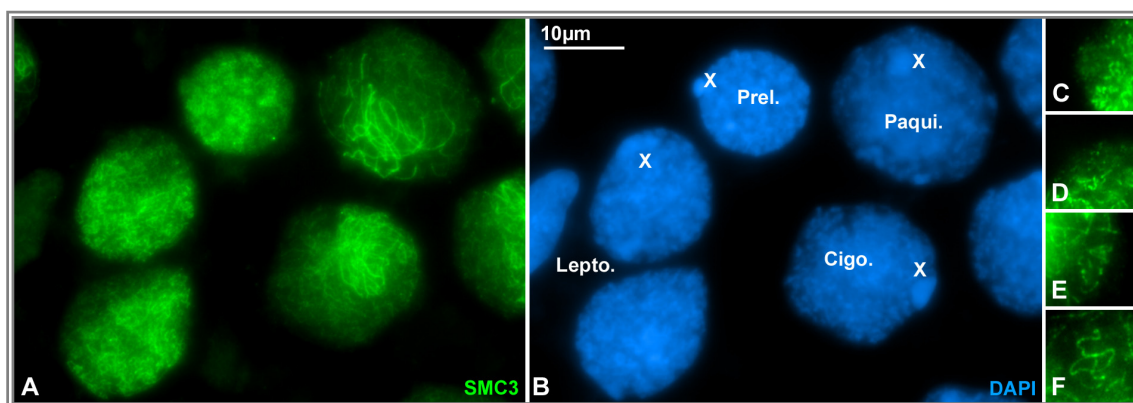
### 6.1. Maduración polarizada de los ejes de cohesina en profase I.

En los machos de *S. grossum*, la inmunolocalización de SMC3, utilizada como marcador de sinapsis en especies como *L. migratoria* y *E. plorans*, revela un patrón no generalizado en la maduración del eje de cohesina (Fig. 42 A), lo que hace especial la identificación de las diferentes etapas meióticas en los machos de *S. grossum*. En este caso, la técnica del aplastado resulta especialmente útil, ya que nos permite identificar diferentes tamaños nucleares y diferentes grados de condensación de la cromatina. En un aplastado de túbulos seminíferos podemos encontrar todas las etapas de la meiosis, así como todo tipo de espermatídas en diferente grado de maduración, permitiéndonos su comparación. Por lo tanto, en un campo podemos distinguir las diferentes etapas de la profase I fijándonos en el grado de la compactación de la cromatina y la maduración de los ejes de cohesina, los cuales avanzan en grado creciente según progresa la meiosis.

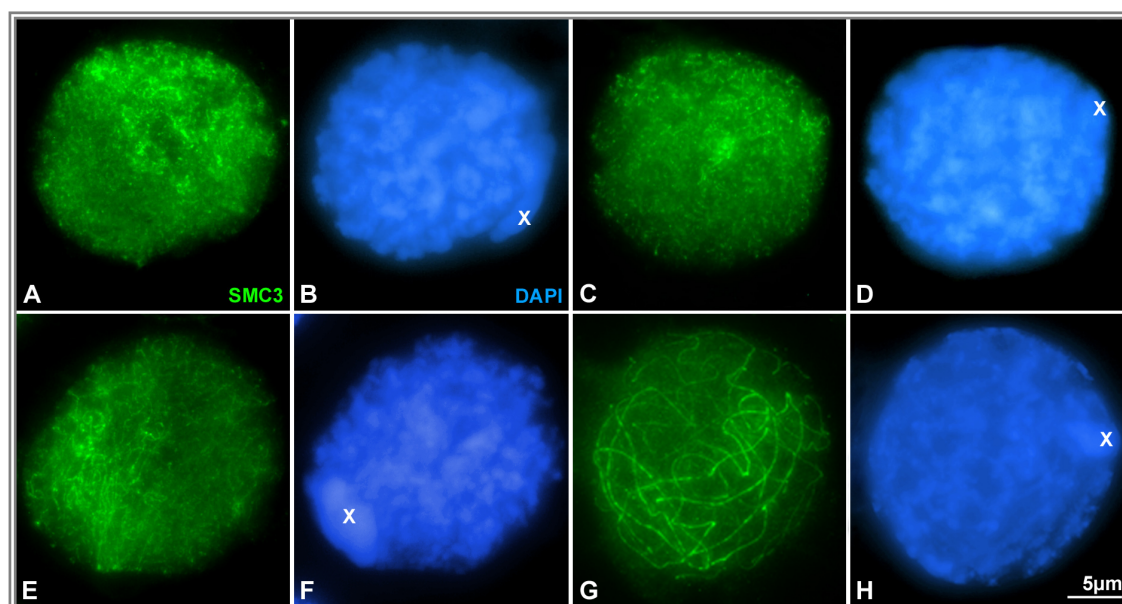
En preleptotena o leptotena muy temprana, los espermatocitos de esta especie se caracterizan por presentar un patrón punteado o de cortos filamentos de la cohesina en una región nuclear, mientras que en el otro dominio del núcleo y en el cromosoma X se

observa un marcaje difuso o nulo (Fig. 42 C y Fig. 43 A). En leptotena tardía, etapa donde los ejes de cohesina deberían estar formados, según hemos observado en las dos especies de saltamontes analizadas anteriormente, detectamos que en los machos de *S. grossum* se distinguen dos regiones nucleares: una donde los finos ejes de SMC3 están bien definidos y otra región que permanece con una apariencia más cercana a etapas de preleptotena, presentando un marcaje uniformemente punteado (Fig. 43 C). Esta situación podemos identificarla como una maduración polarizada del eje de cohesina. En la etapa de leptotena tardía, el cromosoma X presenta un marcaje similar a la región aparentemente retrasada en la formación del eje de cohesina (Fig. 42 D). En cigotena el cromosoma X presenta un eje de SMC3 discontinuo y fino (Fig. 42 E) y en la cromatina autosómica distinguimos dos regiones nucleares, una más avanzada que la otra en el grado de maduración de los ejes de cohesina. (Fig. 43 E). En esta etapa de la meiosis, identificamos por un lado una región nuclear donde se distinguen filamentos de SMC3 maduros y donde se observa asociación por parejas de los mismos. La polarización de esta región recuerda a la organización en “bouquet” y la asociación por parejas de los ejes de SMC3 correspondería al progreso de la sinapsis. Sin embargo, se observa que sólo algunos extremos, aquellos donde se distingue el progreso de la sinapsis, se concentran en dicho dominio nuclear, por lo que quizá en esta especie no deberíamos hablar de un “bouquet” real. Quizá en este caso debamos hablar de “semi-bouquet” o simplemente de una configuración especial del “bouquet”. Por otro lado encontramos una región nuclear aparentemente más desorganizada, donde a pesar de distinguirse líneas continuas de SMC3, no se observa alineamiento de los ejes de cohesina, los cuales aparecen dispersos y cuyos extremos no se concentran en una misma región nuclear (Fig. 43 E). En paquitena se distingue una región nuclear donde se concentran las regiones sinapsadas de los autosomas y donde además suele localizarse el cromosoma X, el cual exhibe un eje de cohesina fino, continuo y desapareado (Fig. 42 F y 43 G). Por otro lado, se observa otra región donde, a pesar de presentar los ejes de SMC3 perfectamente maduros, no se observa sinapsis ni se distingue alineamiento de los ejes de cohesina (Fig. 43 G y video 22 del material suplementario ofrecido en CD).





**Figura 42. Visión general de varios espermatocitos de *S. grossum* tras la inmunodetección de SMC3 (verde) sobre aplastados.** Todas las imágenes son la superposición de diferentes planos focales. La cromatina aparece teñida con DAPI en azul y sobre ella está señalado el cromosoma X. (A y B) Campo de espermatocitos donde se distingue un núcleo en etapa de preleptotena (Prel.). El marcaje de SMC3 muestra un estado muy inicial pero no uniforme en la maduración de los ejes de cohesina. Se distingue el cromosoma X como una protrusión en la periferia nuclear. El diámetro nuclear es el menor de todos los núcleos que aparecen en el campo, además de presentar la cromatina menos compactada. Se distinguen dos leptotenas (Lepto.) cuyos ejes de cohesina se detectan maduros sólo en una región nuclear. El diámetro del núcleo y la compactación de la cromatina son mayores que en leptotena. Se identifica una cigotena (Cigo.) donde se observa la asociación por parejas de los ejes de cohesina polarizada en una región nuclear y se distingue un ligero aumento del diámetro nuclear respecto a leptotena. El cromosoma X en leptotena y cigotena se localiza en la periferia pero no en forma de protrusión. Se distingue un núcleo en paquítina (Paqui.) donde sólo se observa sinapsis en una determinada región nuclear. El tamaño del núcleo y la condensación de la cromatina es mayor que en las células anteriores. (C-F) Detalles de los cromosomas X de preleptotena (C), leptotena (D), cigotena (E) y paquítina (F). La señal de SMC3 detectada en el cromosoma X cambia desde un marcaje difuso en preleptotena (C), pasando por un patrón punteado o de cortos fragmentos en leptotena (D) y un eje inmaduro, discontinuo, en cigotena (E) hasta detectarse un filamento de SMC3 regular fino, continuo y desapareado en paquítina (F).

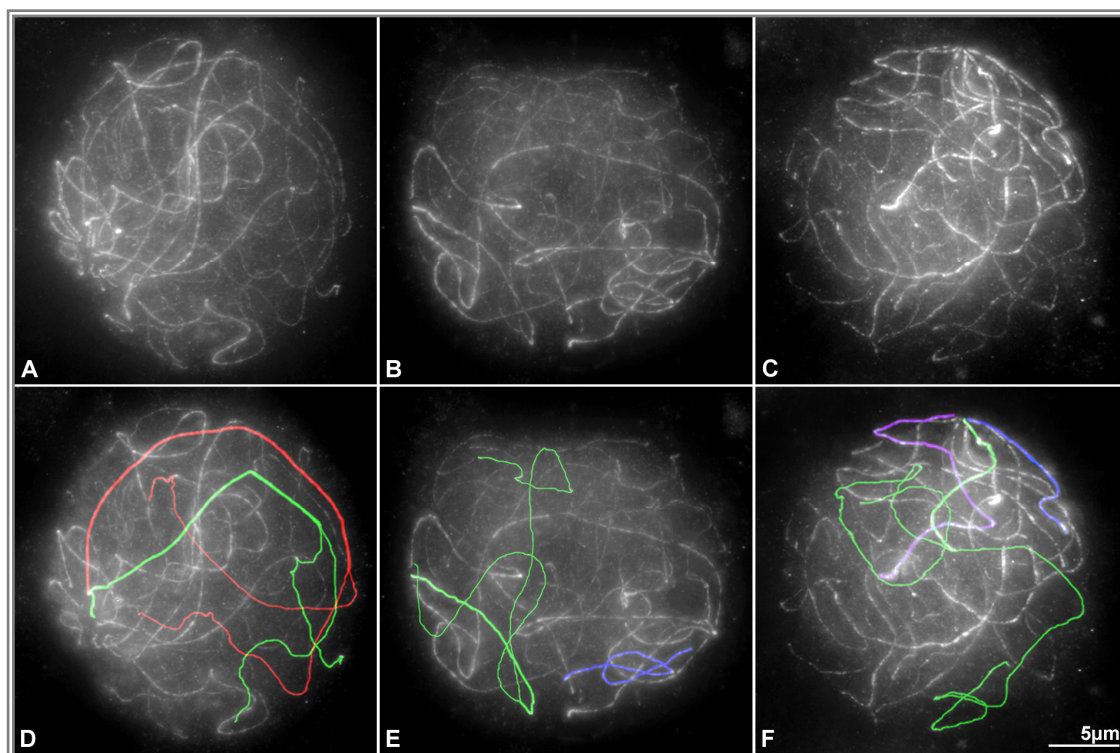


**Figura 43. Inmunolocalización de SMC3 en *S. grossum*: profase I.** La inmunolocalización de SMC3 se observa en verde y la cromatina aparece teñida con DAPI en azul. El cromosoma X aparece señalado. Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. (A y B) Leptotena temprana. Se detecta sólo una región nuclear con cortas líneas de SMC3. (C y D) Leptotena tardía. En un dominio nuclear se detectan filamentos de SMC3, en el resto la apariencia es de preleptotena. (E y F) Cigotena. Se distingue una configuración similar al "bouquet" donde se concentran los filamentos de SMC3 asociados por parejas, dando lugar a filamentos más gruesos. (G y H) Paquítina. Se distingue la región sinapsada como gruesos filamentos de SMC3 y la asinapsada con finos ejes de SMC3.

Al trazar la trayectoria de los filamentos de SMC3 en paquitena, siguiéndolos en los diferentes planos focales obtenidos en un aplastado, se observa cómo los bivalentes largos presentan sinapsis sólo en una parte de su trayectoria, la cual debería corresponder con la región cercana al centrómero y cuyos extremos se concentran en una región nuclear (Jones y Wallace, 1980). Las imágenes muestran como desde el punto donde finaliza la sinapsis, las regiones asinapsadas no exhiben un patrón de alineamiento ni presentan una trayectoria paralela, más bien tienden a dispersarse en la otra región nuclear (Video 22 y 23 del material suplementario ofrecido en CD). Distinguimos por tanto una polarización nuclear relativa a la zona de sinapsis. La medición de la distancia existente entre los telómeros asinapsados de los bivalentes largos (L1-M8) muestra una separación media de 8.682  $\mu\text{m}$  entre ellos. Para el cálculo se seleccionaron 20 bivalentes largos donde se identificaba toda su trayectoria, desde la región sinapsada hasta ambos extremos despareados (Fig. 44 y tabla 3). Por su parte, los bivalentes pequeños exhiben sinapsis completa y su trayectoria se puede seguir de igual forma que los anteriores. En este caso se distingue un eje de SMC3 grueso en toda su longitud (Fig. 43 B y C). Siguiendo con el progreso de la meiosis, en diplotena el eje de cohesina adquiere una conformación con excrecencias, observada en las otras especies de saltamontes, y posteriormente en diacinesis se localiza en el dominio intercromatídico

**Tabla 3: Distancia entre los telómeros desinápticos de 20 bivalentes largos (L1-M8) de *S. grossum*.**

	Distancia ( $\mu\text{m}$ )		Distancia ( $\mu\text{m}$ )
Bivalente 1	7.3	Bivalente 11	8.62
Bivalente 2	7.6	Bivalente 12	9.8
Bivalente 3	3.14	Bivalente 13	7.6
Bivalente 4	15.8	Bivalente 14	12.3
Bivalente 5	10.7	Bivalente 15	4.4
Bivalente 6	8.9	Bivalente 16	8.4
Bivalente 7	9.6	Bivalente 17	8.5
Bivalente 8	4.18	Bivalente 18	7.6
Bivalente 9	10.4	Bivalente 19	13.9
Bivalente 10	9.2	Bivalente 20	5.7
Media total: 8.682 $\mu\text{m}$			

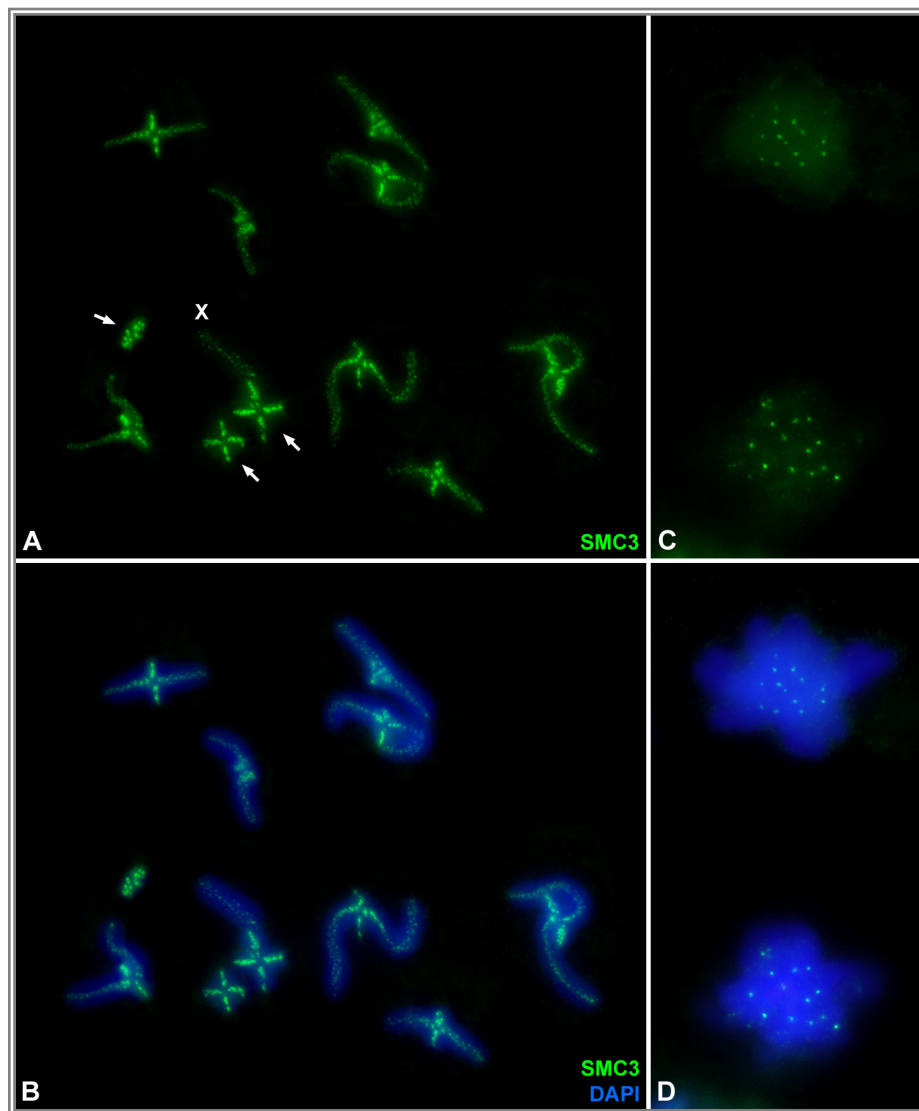


**Figura 44. Seguimiento de bivalentes en paquitena tras la inmunodetección de SMC3 en *S. grossum*.** La señal de SMC3 se muestra en blanco y negro. Los ejes de SMC3 de 7 bivalentes se marcan en verde, rojo, azul y morado. (A-C) Suma de todos los planos que comprenden el volumen nuclear de tres paquitenas. (D-F) Suma de los planos donde se ha marcado el recorrido de los diferentes bivalentes seleccionados. (D) Marcaje de dos bivalentes largos con sinapsis parcial (rojo y verde) en la paquitena de A. (E) Seguimiento de un bivalente largo con sinapsis parcial (verde) y un bivalente corto con sinapsis completa (azul) en la paquitena de B. (F) Marcaje de un bivalente largo con sinapsis parcial (verde) y dos bivalentes cortos con sinapsis completa (azul y morado) en la paquitena de C.

## **6.2. Distribución de la cohesina SMC3 y estructura cromosómica en metafase I.**

En metafase I, la cohesina SMC3 se encuentra en el dominio intercromatídico de todos los cromosomas, interrumpiéndose su señal en el punto de quiasma de los bivalentes (Fig. 45 A y B). La señal entre cromátidas hermanas desaparece en la transición metafase I – anafase I, pero SMC3 se detecta como un punto bajo el centrómero de todos los cromosomas en anafase I y telofase I, igual que en *L. migratoria* y *E. plorans* (Fig. 45 C y D). A partir de este punto ya no hemos vuelto a detectar a la cohesina SMC3 en ninguna etapa de la meiosis en ninguna de las tres especies analizadas. Estudiando en detalle la señal de SMC3 en el dominio intercromatídico en metafase I, distinguimos que el marcaje no es uniforme en todos los cromosomas (Fig. 46 A-F). Así, mientras los bivalentes M9, S10 y S11 y la región proximal de los 8 restantes presentan en aplastado (vista frontal) una señal lineal a parches continuos, el cromosoma X y las regiones distales de los bivalentes L1-M8 muestran un marcaje que

recuerda a un zigzag. Estas últimas son precisamente las regiones que han sido definidas como asinápticas en profase I (Fletcher, 1977). Por lo tanto, las regiones sinápticas se distinguen de las regiones asinápticas por la señal que define SMC3 en el dominio intercromatídico en metafase I.

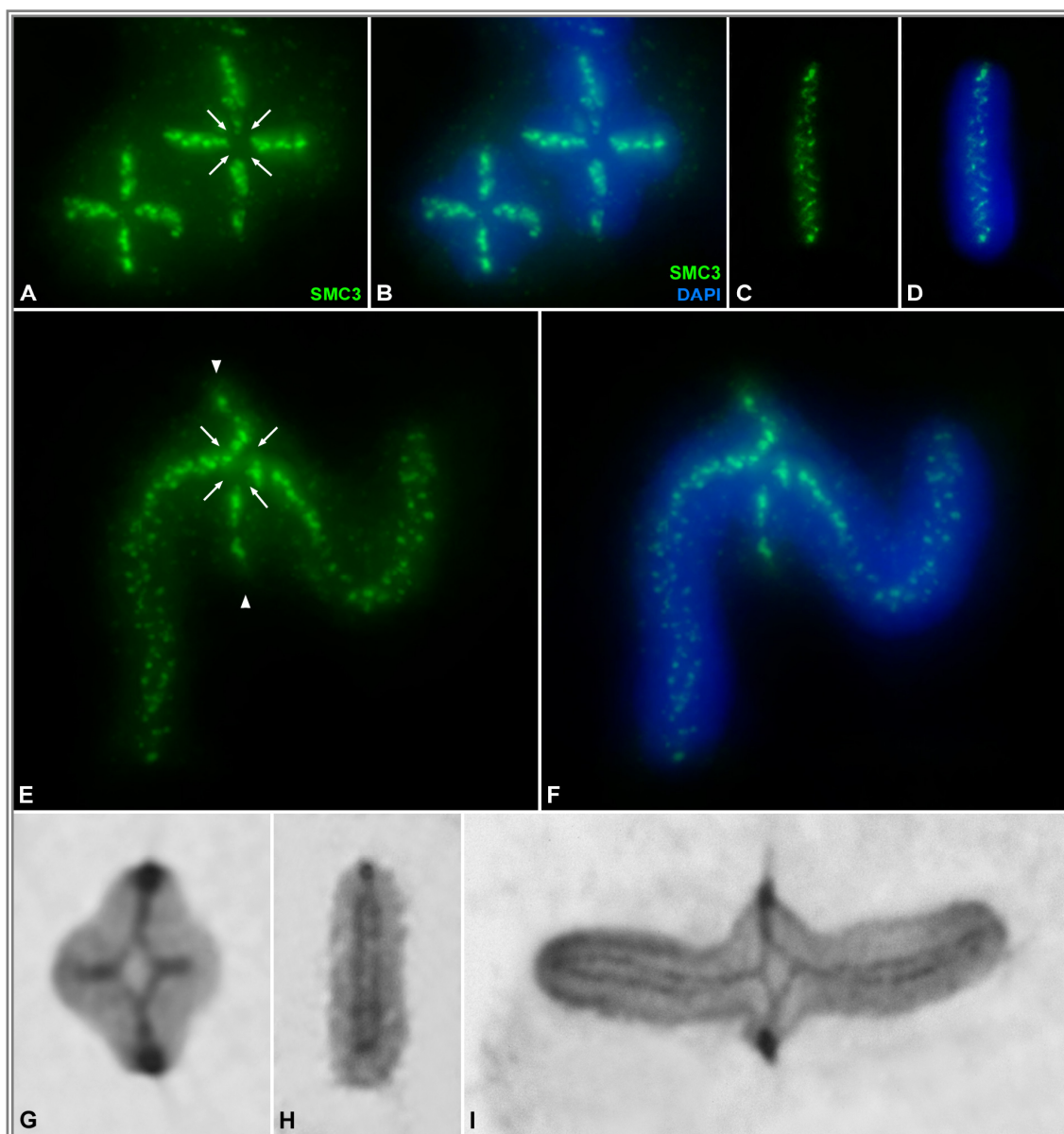


**Figura 45: Inmunolocalización de SMC3 en *S. grossum*: cromosomas condensados.** Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. La señal de SMC3 se muestra en verde, mientras que la cromatina se tiñó con DAPI y aparece en azul. (A y B) Metafase I donde se contabilizan los 11 bivalentes del complemento de la especie, los tres más pequeños (M9, S10 y S11) están identificados con una flecha blanca. El cromosoma X aparece señalado (X). SMC3 se localiza en el dominio intercromatídico de todos los cromosomas. (C y D) Telofase I. SMC3 se localiza en los centrómero de los cromosomas.

A su vez, la tinción con plata revela dos organizaciones diferentes. Los ejes cromatídicos de los bivalentes con sinapsis completa y la región proximal de los bivalentes con sinapsis parcial están íntimamente asociados en toda su longitud, abriéndose en el punto de quiasma (Fig. 46 G e I). Sin embargo, en la región distal de los



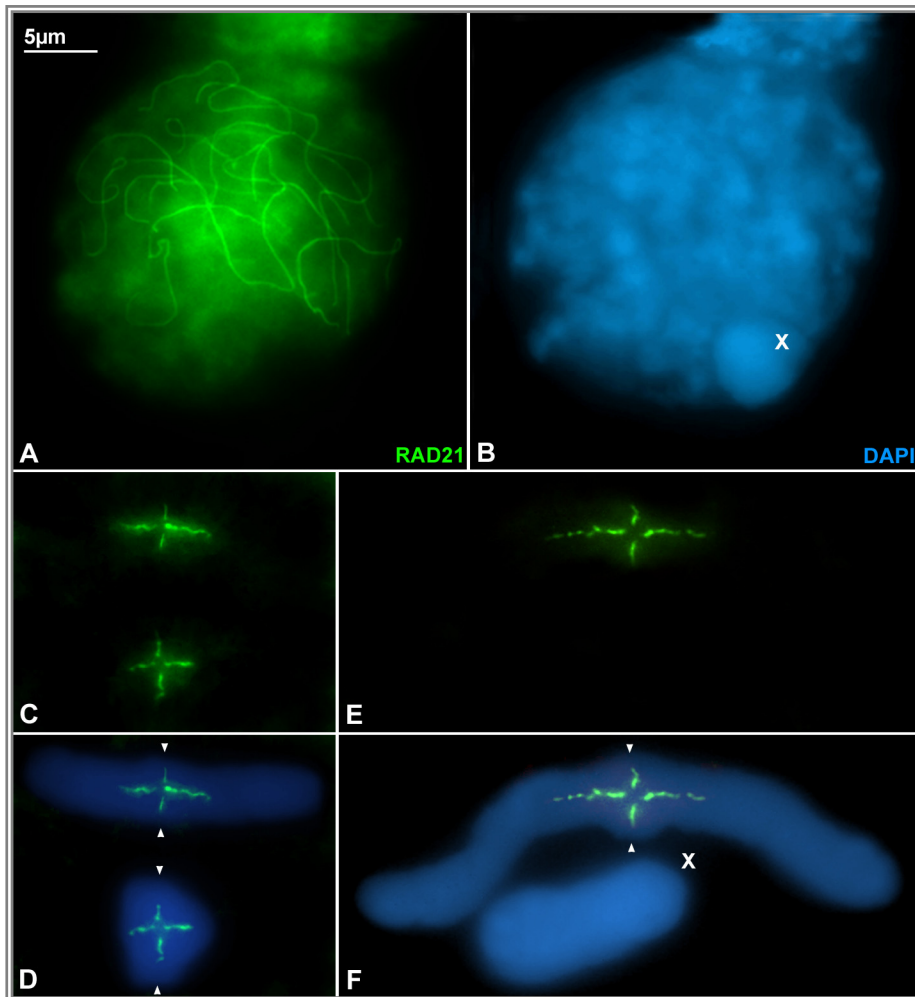
cromosomas L1-M8, región asináptica, los ejes cromatídicos están separados, uniéndose en los extremos del cromosoma (Fig. 46 I). Esta organización se observa también en el cromosoma X, donde los ejes cromatídicos aparecen muy juntos sólo en los extremos cromosómicos (Fig. 46 H).



**Figura 46. Inmunolocalización de SMC3 e impregnación argéntica en cromosomas de metafase I en *S. grossum*.** (A-F) Inmodetección de SMC3 (verde). La cromatina teñida con DAPI se muestra en azul. Todas las imágenes son la superposición de varios planos focales. (A y B) Bivalente M9 y S10, ambos con un quiasma intersticial, con señal de SMC3 a parches en todo el dominio intercromatídico, excepto en el punto de quiasma donde se interrumpe (flechas blancas). (C y D) Cromosoma X. La señal de SMC3 describe un patrón en zig-zag en su dominio intercromatídico. (E y F) Bivalente largo con señal de SMC3 en todo el dominio intercromatídico excepto en el punto de quiasma (flechas blancas). Los extremos centroméricos están marcados con cabezas de flecha. La señal de SMC3 en la región proximal es más lineal que en los extremos distales, donde aparece con un patrón más difuso. (G-I) Impregnación argéntica, la cual revela los centrómeros y los ejes cromosómicos. (G) Bivalente M9 con los ejes cromosómicos íntimamente asociados excepto en el punto de quiasma donde se abren. (H) Cromosoma X con los ejes cromosómicos abiertos, unidos en el extremo centromérico y en el extremo distal (I) Bivalente largo con los ejes cromosómicos abiertos en los extremos distales, unidos en el extremo más distal, pero íntimamente asociados alrededor del quiasma en la región proximal.

### 6.3. Detección de RAD21 en regiones de sinapsis.

Nuestros resultados muestran que RAD21 se detecta a partir de cigotena, simultáneamente con el progreso de la sinapsis. En el sistema de sinapsis incompleta que presentan los machos de *S. grossum*, RAD21 sólo se detecta en una región nuclear en paquitena, observando una parte del núcleo carente de filamentos de cohesina, incluido el cromosoma X (Fig. 47 A). En metafase I, RAD21 se observa en todo el dominio intercromatídico de los bivalentes M9, S10 y S11, pero en los bivalentes L1-M8 se detecta sólo en la región proximal, no observándose señal de RAD21 ni en la región distal de los bivalentes L1-M8, ni en el dominio intercromatídico del cromosoma X (Fig. 47 C-F). Por lo tanto, la detección de RAD21 coincide con las regiones de sinapsis.

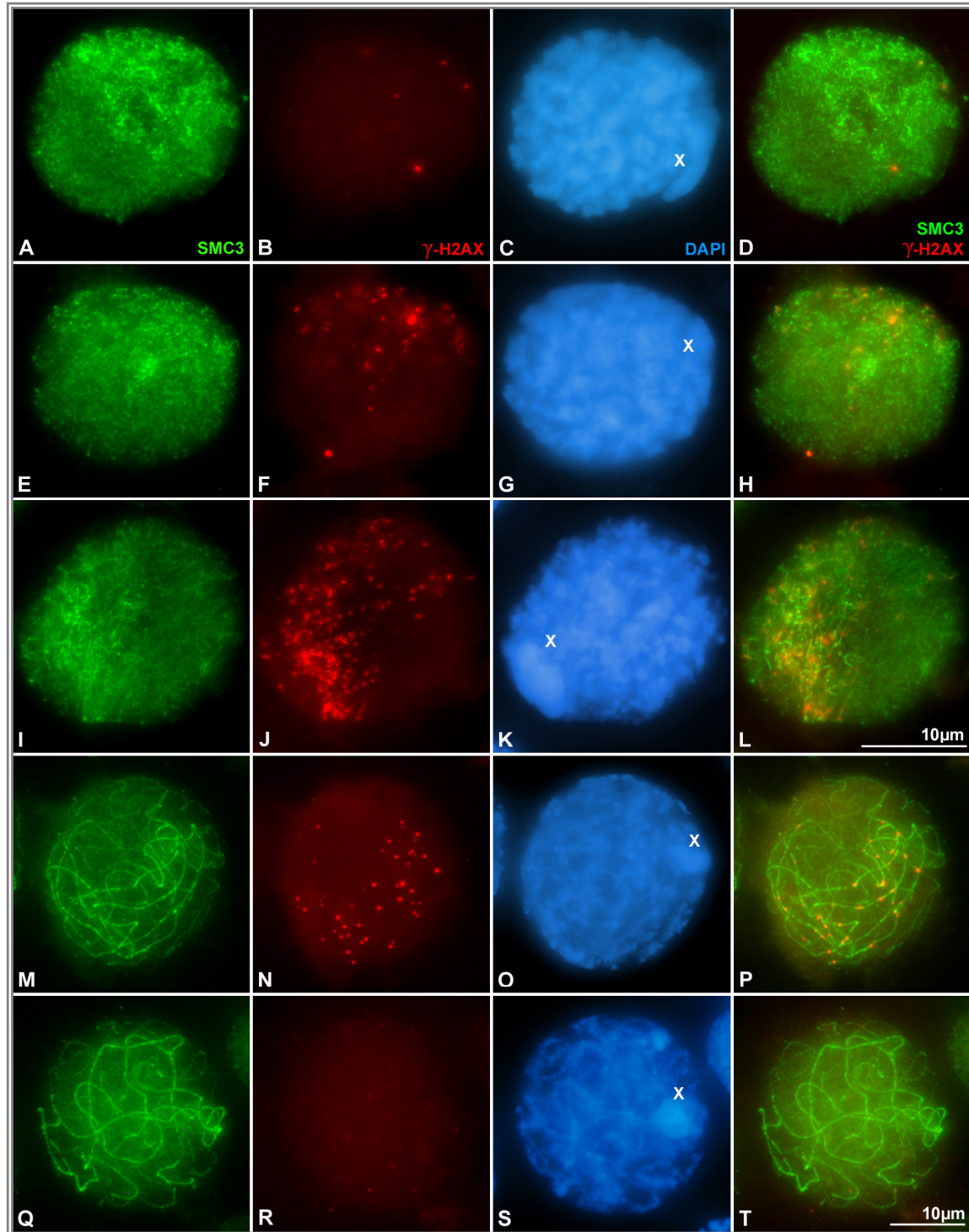


**Figura 47. Inmunolocalización de RAD21 (verde) en *S. grossum*.** La cromatina aparece en azul teñida con DAPI. Todas las imágenes son la suma de varios planos focales. El cromosoma X está marcado. (A y B) Paquitena. Se detecta una región nuclear carente de ejes de filamentos de RAD21. (C y D) Cromosoma largo (arriba) y cromosoma S10 (abajo) en metafase I. (E y F) Cromosoma largo (arriba) y cromosoma X (abajo). En los cromosomas largos RAD21 se detecta en la región proximal. En el cromosoma S10 RAD21 se detecta en todo el dominio intercromatídico. Los centrómeros se indican con cabezas de flecha. En el dominio intercromatídico del cromosoma X y en la región distal de los cromosomas largos no se detecta RAD21.

## 7. Polarización de $\gamma$ -H2AX, RAD51 y H3K9me3.

### 7.1. Detección polarizada de $\gamma$ -H2AX y RAD51 previa a la sinapsis.

Mediante la doble inmunolocalización de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX en aplastados de espermatoцитos pudimos comprobar la relación temporal y espacial entre los procesos de sinapsis y el inicio de la recombinación en *S. grossum*. Antes de que comience la sinapsis, en leptotena temprana se observa un discreto marcaje de puntos de  $\gamma$ -H2AX restringido a las regiones nucleares donde el patrón de SMC3 indica un mayor progreso en la formación del eje de cohesina (Fig. 48 A-D). En leptotena tardía observamos un incremento en el marcaje de  $\gamma$ -H2AX, localizado exclusivamente en las regiones más avanzadas en la formación de los filamentos de SMC3 (Fig. 48 E-H y video 24 del material suplementario ofrecido en CD). En cigotena, reconocemos la región donde progresa la sinapsis porque los ejes de SMC3 están bien definidos, se alinean y se asocian por parejas. Es precisamente en esa región nuclear donde se observan localizados los focos de  $\gamma$ -H2AX, encontrando que el resto del núcleo carece de señal de la histona fosforilada (Fig. 48 I-L). En paquitena temprana se distinguen discretos puntos de  $\gamma$ -H2AX sólo sobre los ejes de cohesina gruesos, es decir, sinapsados. Las regiones cromosómicas donde la sinapsis no se completa y muestran una trayectoria irregular de los ejes de SMC3, nunca muestran marcaje con  $\gamma$ -H2AX (Fig. 48 M-P y video 25 del material suplementario ofrecido en CD). Durante la progresión del estadio de paquitena, el número de puntos de  $\gamma$ -H2AX se va reduciendo, hasta ser nulo en paquitena tardía (Fig. 48 Q-T). Es destacable que, contrariamente a lo encontrado en *L. migratoria* y *E. plorans*, en los machos de *S. grossum* no se ha detectado marcaje de  $\gamma$ -H2AX sobre la cromatina del cromosoma X en ninguna etapa de la profase I. Este hecho se comprobó no sólo mediante la doble inmunolocalización de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX, sino también tras la inmunodetección simple de  $\gamma$ -H2AX. Si en algún núcleo de la figura 48 aparece algún punto de  $\gamma$ -H2AX sobre la cromatina del univalente sexual, es un efecto debido a la proyección de los diferentes planos focales. Al igual que en *L. migratoria* y *E. plorans*,  $\gamma$ -H2AX marca intensamente el núcleo de las espermátidas (imagen no mostrada).



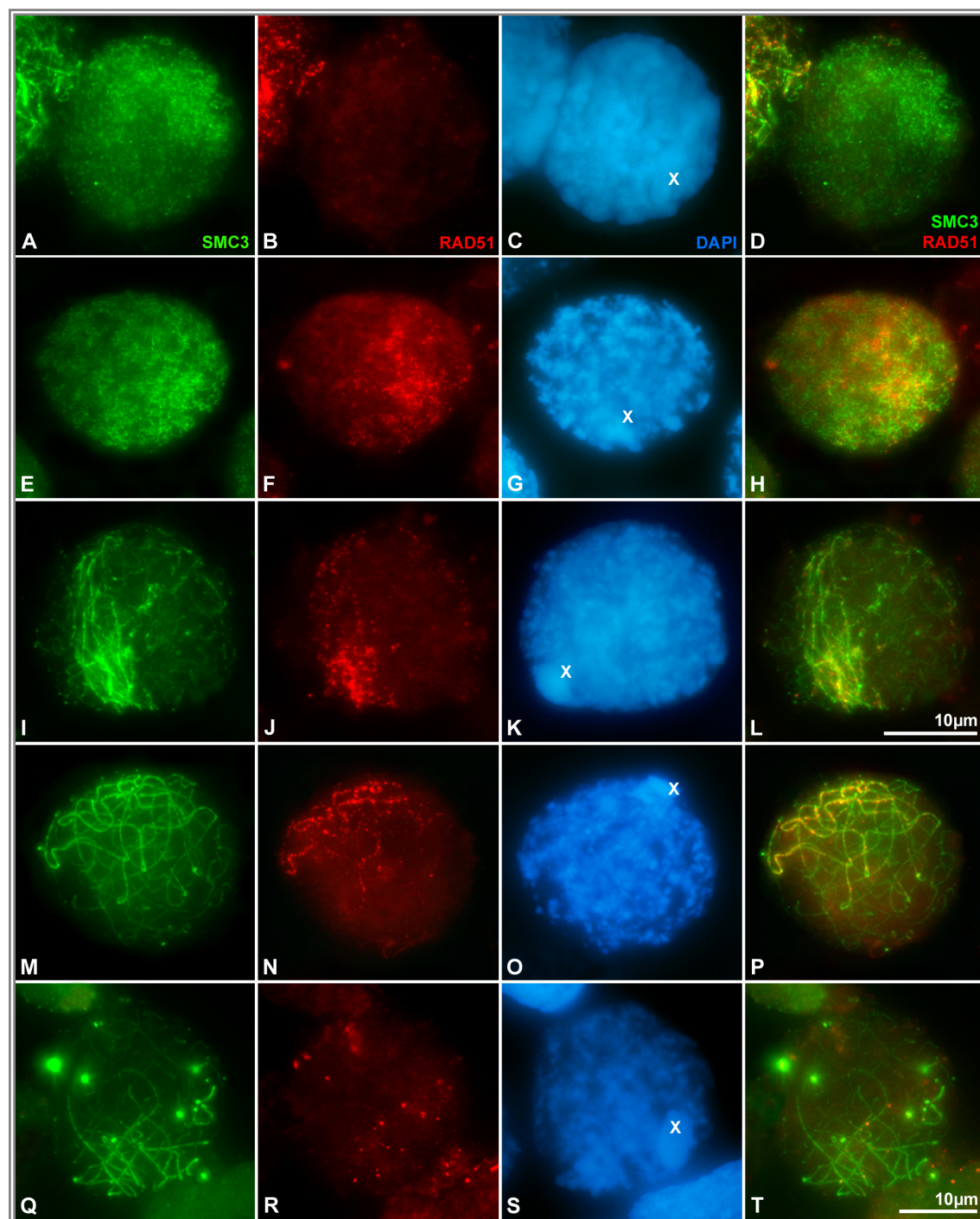
**Figura 48. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y  $\gamma$ -H2AX (rojo) en espermatocitos de *S. grossum*.** La cromatina se tiñó con DAPI y se muestra en azul. En la cuarta columna se presenta la superposición de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX. Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. (A-D) Leptotena temprana. Focos discretos de  $\gamma$ -H2AX, se polarizan en una región nuclear sobre las señales de SMC3 más definidas. (E-H) Leptotena tardía. El número de focos de  $\gamma$ -H2AX aumenta y se localizan sobre las regiones en las que se aprecia una mayor definición en los ejes de SMC3. (I-L) Cigotena. Se mantiene una polarización nuclear tanto en la organización del eje de SMC3 (I), como en la localización de los focos de  $\gamma$ -H2AX (J). (M-P) Paquítena temprana. El marcaje de SMC3 define dos regiones nucleares, una con filamentos gruesos y otra con filamentos finos. Focos discretos de  $\gamma$ -H2AX se localizan sobre los ejes de SMC3 gruesos. (Q-T) Paquítena tardía. Distinguimos las mismas dos regiones nucleares pero no se detecta señal de  $\gamma$ -H2AX. La barra en L es relativa al tamaño de los núcleos de A hasta L. La barra en T es relativa al tamaño de los núcleos de M hasta T.



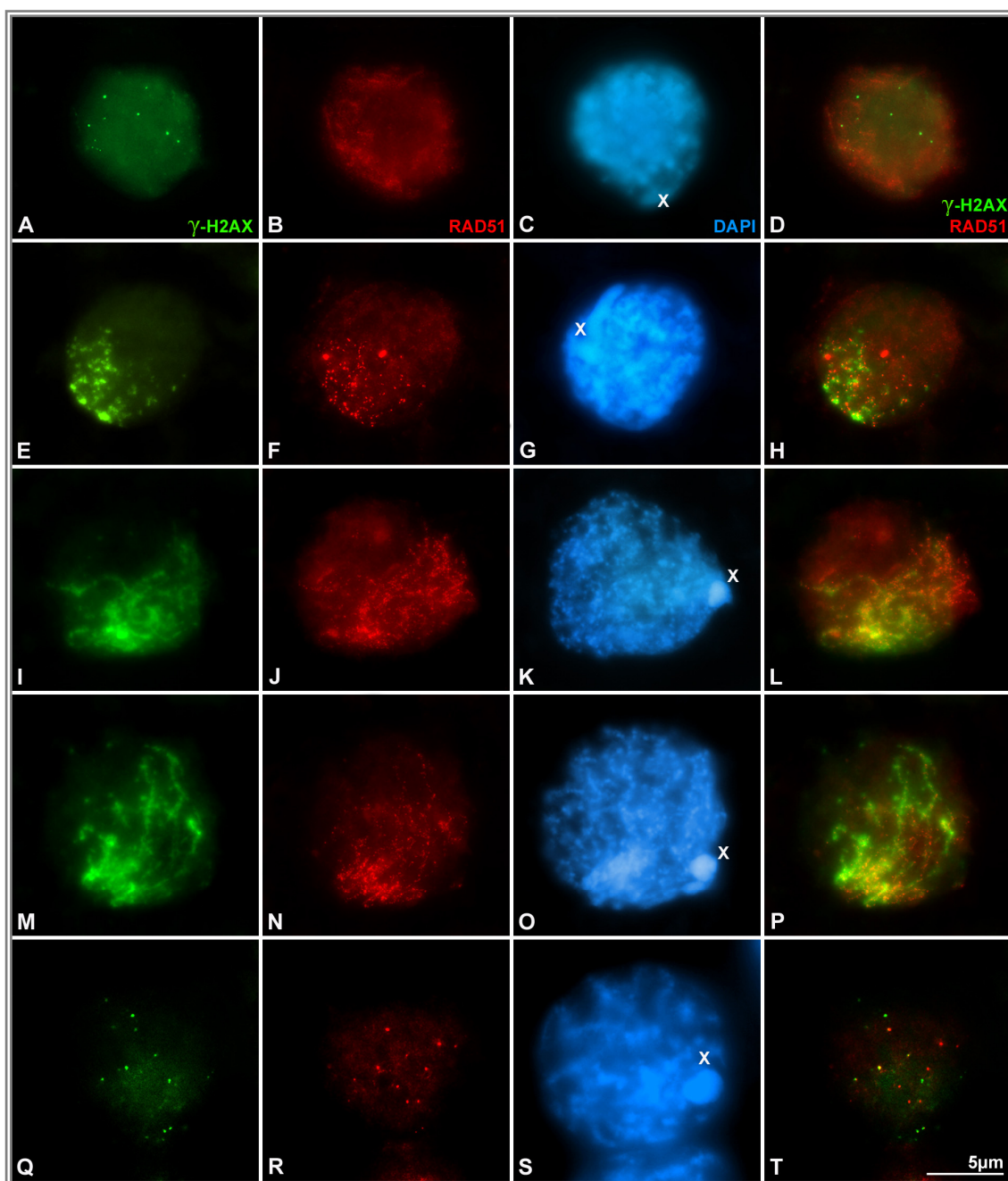
La doble inmunolocalización de SMC3 y RAD51 muestra que la recombinasa está ausente en etapas de leptotena temprana (Fig. 49 A-D). En leptotena tardía, sin embargo, hemos observado puntos de RAD51 localizados sobre aquellos ejes de cohesina que están más avanzados en su maduración, los cuales se encuentran polarizados en una región nuclear (Fig. 49 E-H). El resto del núcleo carece de señal de RAD51. En cigotena (Fig. 49 I-L) el marcaje de RAD51 se localiza exclusivamente sobre los ejes de cohesina polarizados en la región nuclear donde está ocurriendo la sinapsis, bien sobre regiones ya sinapsadas o bien sobre ejes de SMC3 donde se aprecia alineamiento y una mayor maduración del eje de cohesina (Fig. 49 L). Desde paquitenia temprana (Fig. 49 M-P) a media (Fig. 49 Q-T), el número de puntos de RAD51 decrece, localizándose exclusivamente sobre los ejes de cohesina de las regiones sinapsadas de los autosomas. En etapas posteriores a paquitenia no hemos detectado marcaje de RAD51, así como dicha proteína tampoco se detecta en la cromatina del cromosoma X en ninguna etapa de la profase I.

## **7.2. El marcaje de $\gamma$ -H2AX y RAD51 coinciden en la misma región.**

Con el fin de comprobar si la distribución espacial de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 coinciden, realizamos la doble inmunolocalización en aplastados de espermatoцитos. Tomando como referencia el marcaje observado anteriormente para ambas proteínas y la tinción de la cromatina con DAPI, podemos determinar la etapa de la profase I en la que se encuentran los espermatoцитos. De esta forma, en leptotena temprana se detecta señal de  $\gamma$ -H2AX pero no de RAD51 (Fig. 50 A-D). En leptotena tardía se observan los primeros focos de RAD51, polarizados en misma región nuclear donde encontramos el marcaje de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 50 E-H). En cigotena, encontramos un marcaje amplio de ambas proteínas, describiendo en muchos casos nubes de  $\gamma$ -H2AX sobre las que se localizan puntos de RAD51 (Fig. 50 I-P). En todos los casos detectamos una región del núcleo carente de marcaje de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51. En paquitenia, tanto la señal de la variante histónica como la de la recombinasa quedan reducidas a discretos puntos, cercanos entre sí pero que no colocalizan (Fig. 50 Q-T). Esta doble inmunolocalización de nuevo muestra la ausencia de marcaje tanto de  $\gamma$ -H2AX como de RAD51 en la cromatina del univalente sexual.



**Figura 49. Doble inmunolocalización de SMC3 (verde) y RAD51 (rojo) en *S. grossum*: profase I.** En la tercera columna se muestra la cromatina teñida con DAPI (azul) y sobre ella está marcada la posición del X. La superposición de las imágenes de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX se muestra en la cuarta columna. Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. (A-D) Leptotena temprana. SMC3 detecta cortas líneas de cohesina polarizadas en una región nuclear. En esta etapa no se observa señal con RAD51. (E-H) Leptotena tardía. Se detectan focos de RAD51 polarizados en una región nuclear sobre los ejes de cohesina más definidos. (I-L) Cigotena. Los focos de RAD51 se polarizan en la región donde progresa la sinapsis o sobre los ejes de cohesina que exhiben alineamiento. (M-P) Paquitena temprana. (Q-T) Paquitena media. Los focos de RAD51 se concentran sobre los ejes de SMC3 gruesos correspondientes a regiones sinapsadas. La barra en L es relativa al tamaño de los núcleos de A hasta L. La barra en T es relativa al tamaño de los núcleos de M hasta T.



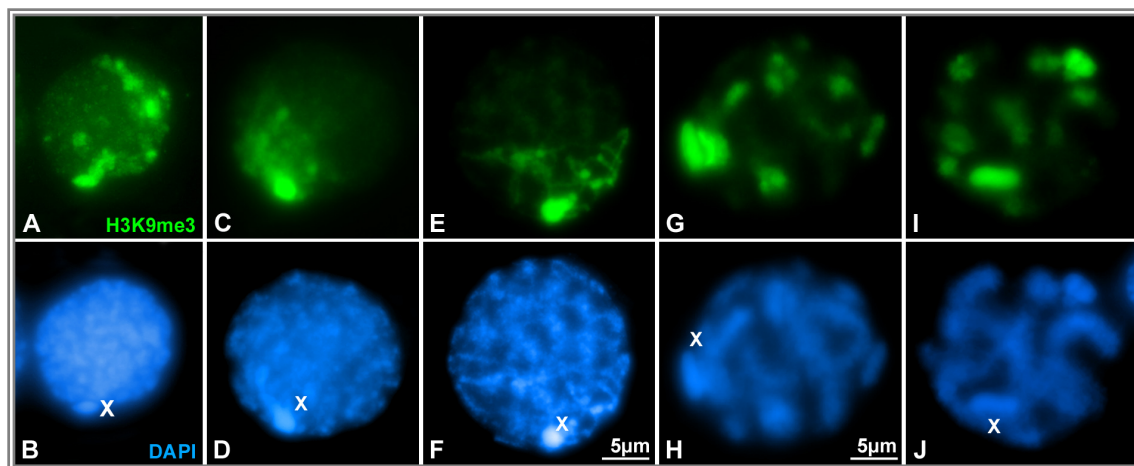
**Figura 50. Doble inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX (verde) y RAD51 (rojo) en *S. grossum*.** La cromatina está teñida en azul con DAPI. Las imágenes de la cuarta columna son la suma de las señales de  $\gamma$ -H2AX y RAD51. Todas las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. (A-D) Leptotena temprana. No hay señal de RAD51 pero se detectan focos discretos de  $\gamma$ -H2AX (A). (E-H) Leptotena tardía. Aumenta la señal de  $\gamma$ -H2AX y se detectan focos de RAD51 en esa misma región nuclear. (I-L) Cigotena temprana y (M-P) cigotena tardía. Aumenta la señal de ambas proteínas y se polarizan en la misma región nuclear. (Q-T) Paquitena. La señal de RAD51 y de  $\gamma$ -H2AX queda restringida a discretos focos en posiciones cercanas entre sí.

De estos datos inferimos que la presencia de  $\gamma$ -H2AX y RAD51 es anterior al inicio de la sinapsis. Además hemos observado que el marcaje de  $\gamma$ -H2AX es previo al de RAD51 y ambas proteínas se localizan de forma polarizada en un mismo dominio

nuclear en la profase I de los machos de *S. grossum*. Ese dominio nuclear coincide con las regiones cromosómicas que presentan sinapsis.

### 7.3. Localización de H3K9me3.

La polarización de  $\gamma$ -H2AX que hemos encontrado durante la profase I de *S. grossum*, puede relacionarse directamente con una polarización de las “DSB” (Rogakou y col., 1998). Se sabe que la accesibilidad de la cromatina a la maquinaria de recombinación puede estar influenciada por su composición y modificación (Fan y Petes, 1996; de Massy, 2003; Sims y col., 2003). En este sentido quisimos estudiar algunas modificaciones de histonas y hemos encontrado que la trimetilación de la histona H3 en su lisina 9 (H3K9me3) y en su lisina 27 (H3K9me27), comparten un patrón de polarización similar al observado con  $\gamma$ -H2AX en profase I. Debido a la similitud encontrada entre H3K9me3 y H3K27me3 sólo describiremos los resultados de la primera. La única diferencia entre las señales de ambas modificaciones es que mientras la H3K9me3 marca intensamente el cromosoma X, la H3K27me3 nunca se ha detectado en la cromatina del univalente sexual. En la profase I de los machos de *S. grossum*, hemos observado que el marcaje de H3K9me3 sobre la cromatina autosómica se polariza en una región nuclear desde leptotena hasta paquitena (Fig. 51 A-F).

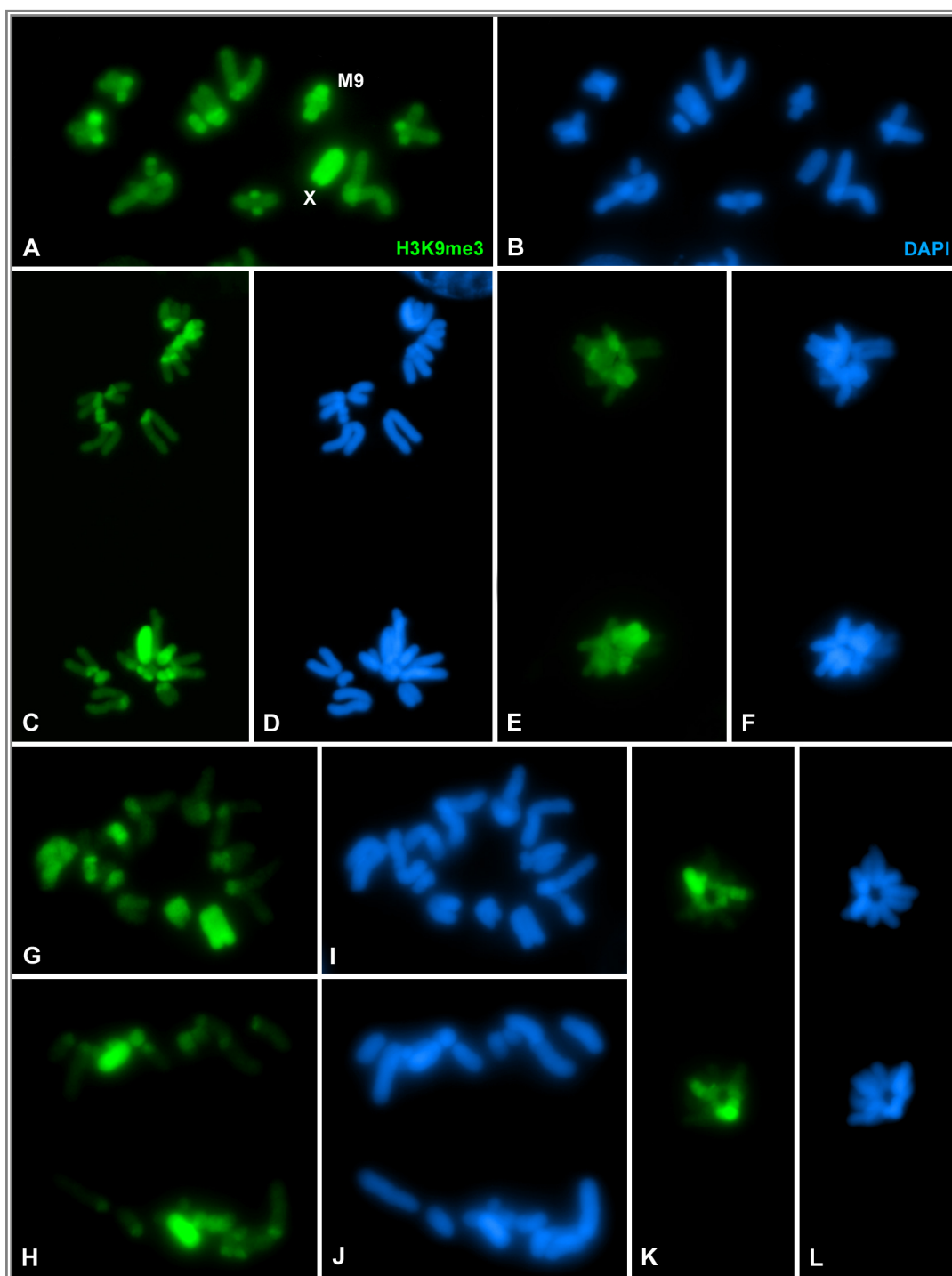


**Figura 51. Inmunolocalización de H3K9me3 (verde) en *S. grossum*.** La cromatina se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. El cromosoma X se ha señalado sobre la cromatina. (A y B) Leptotena. (C y D) Cigotena. (E y F) Paquitena. (G y H) Diplotena. (I y J) Diacinesis. En todas las etapas la señal de H3K9me3 se polariza en una región nuclear y se distingue intensamente sobre el cromosoma X. La barra en F es relativa al tamaño de los núcleos desde A hasta F. La barra en H es relativa al tamaño de los núcleos de G, H, I y J.

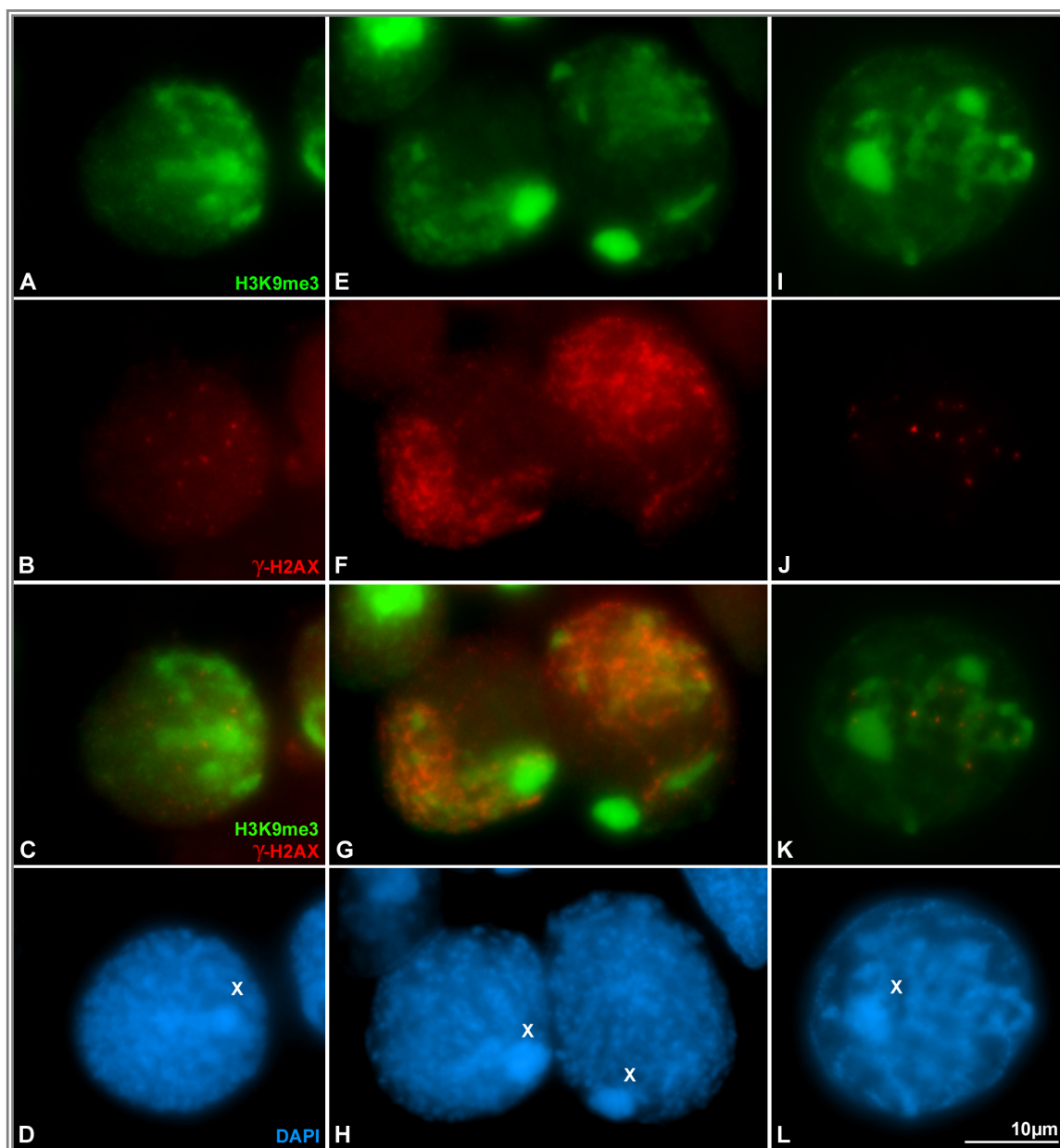
En leptotena temprana se observan regiones de cromatina marcadas con H3K9me3 ligeramente dispersas. Pero ya a partir de leptotena tardía se polarizan en un determinado dominio nuclear. En cigotena y paquitena se distingue de nuevo una polarización del de marcaje de H3K9me3 en un determinado dominio nuclear (Fig. 51 C-F). El cromosoma X suele incluirse en ese dominio y aparece fuertemente marcado. Una vez los bivalentes comienzan a verse más individualizados en diplotena y diacinesis la señal de H3K9me3 se localiza en determinadas regiones de los cromosomas, correspondiendo probablemente a las regiones proximales de los cromosomas (Fig. 51 G-J). De nuevo, el cromosoma X se distingue porque aparece fuertemente teñido con el anticuerpo contra H3K9me3.

En metafase I, la señal de H3K9me3 se localiza en las regiones proximales de todos los autosomas y además observamos que la toda la cromatina del cromosoma X y del M9 están fuertemente marcadas (Fig. 52 A). En profase I, no podemos distinguir la posición del bivalente M9, pero consideramos que puede estar marcado igual que el X por los resultados de metafase I. Este patrón se repite desde anafase I hasta telofase II (Fig. 52 C-L). La histona modificada H3K9me3 está relacionada en mamíferos con heterocromatina y se muestra enriquecida en los centrómeros de *D. melanogaster* (Fuchs y col., 2006; Zinner y col., 2006). Por lo tanto podríamos pensar por el patrón observado en *S. grossum*, que modificación histónica H3K9me3 también se relacione con heterocromatina pericentromérica en esta especie, al menos en algunos de sus cromosomas. Estos resultados muestran que la trimetilación de H3 en K9 en las regiones proximales de los autosomas, excepto el M9, podría mantenerse en toda la meiosis. Quisimos comprobar si las regiones cromosómicas marcadas con H3K9me3 y la cromatina donde detectamos a  $\gamma$ -H2AX coinciden. Para esto, realizamos una doble inmunolocalización contra ambas histonas y observamos que tanto en leptotena tardía, como en cigotena y paquitena la señal de  $\gamma$ -H2AX se localiza, polarizada en un dominio nuclear, sobre la cromatina marcada con H3K9me3 (Fig. 53).





**Figura 52. Inmunolocalización de H3K9me3 (verde) en *S. grossum*.** La cromatina se tiñó con DAPI (azul). Las imágenes corresponden a la suma de diferentes planos focales. El cromosoma X y el M9 se han señalado en A. (A y B) Metafase I. (C y D) Anafase I. (E y F) Telofase I. (G y H) Metafase II. (I y J) Anafase II. (K y L) Telofase II. En todas las etapas la señal de H3K9me3 se concentra en la cromatina pericentromérica de los cromosomas.



**Figura 53. Doble inmunodetección de H3K9me3 y  $\gamma$ -H2AX en la profase I de *S. grossum*.** Todas las imágenes son la superposición de varios planos focales tomados tras la inmunolocalización de H3K9me3 (verde) y  $\gamma$ -H2AX (rojo). La cromatina aparece en azul (DAPI). El La posición del cromosoma X se indica sobre la cromatina. (A-D) Leptotena tardía. Se detectan discretos puntos de  $\gamma$ -H2AX sobre la cromatina autosómica marcada con H3K9me3. (E-H) Dos cigotenas. El marcaje de H3K9me3 y  $\gamma$ -H2AX están polarizados en la misma región nuclear (I-L) Paquitena. Unos pocos focos de  $\gamma$ -H2AX se disponen sobre la cromatina marcada con H3K9me3.

## *Efectos de la irradiación Gamma en la Meiosis de machos de Stethophyma grossum.*

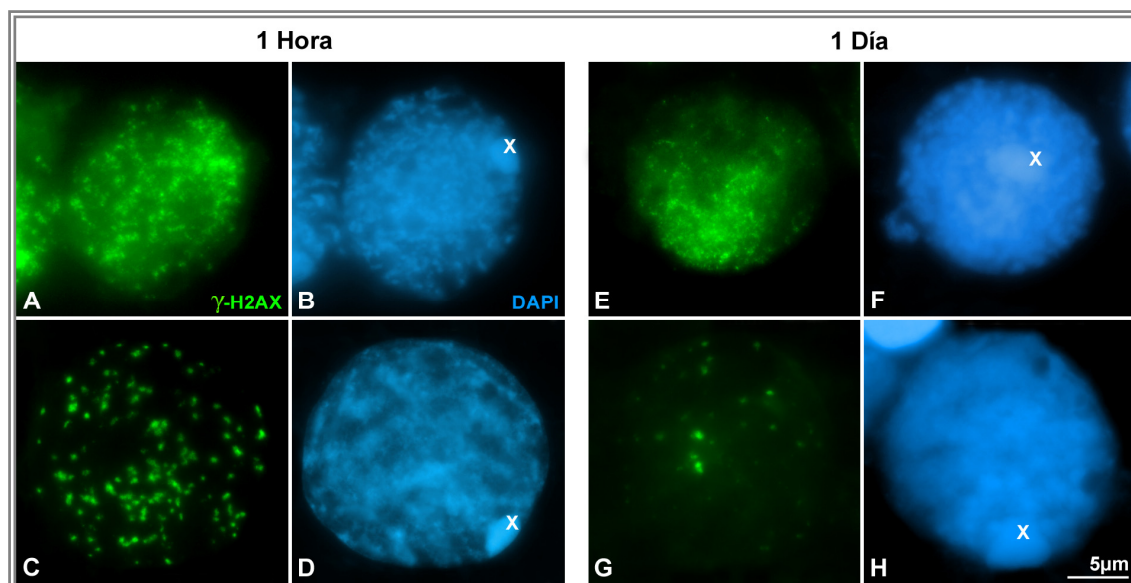
### **8. Inducción de “DSB” en toda la cromatina.**

La aplicación de un tratamiento con rayos gamma tiene como consecuencia la generación de “DSB” que pueden ser detectadas con  $\gamma$ -H2AX (Mahadevaiah y col., 2001; Storlazzi y col., 2003; Sánchez-Morán y col., 2007). Los machos de *S. grossum* presentan restricción de “DSB”, sinapsis parcial y localización proximal del quiasma único en los bivalentes L1-M8. En esta memoria queremos estudiar si induciendo “DSB” en toda la cromatina el patrón sináptico y/o de recombinación recíproca de la especie cambia. Para calcular la dosis subletal de irradiación que debemos aplicar a los saltamontes se realizaron pruebas con intensidades que variaron entre 1Gy y 10Gy. El efecto sobre la cromatina se comprobó mediante inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX, desde una hora después de la irradiación. Gareth H. Jones (1971) describió que la duración de la meiosis en los machos de *S. grossum* es de 12 días desde el periodo S hasta metafase I. Por lo tanto, se analizaron mediante tinción con orceína acética los meiocitos de varios individuos entre 1 y 12 días después del tratamiento, para asegurarnos así que observamos a las células que han sufrido la irradiación al menos hasta metafase I.

Una hora después de la irradiación con una dosis de 1Gy, el marcaje de  $\gamma$ -H2AX se extiende por toda la cromatina en todas las etapas de la meiosis. De esta forma, observamos que espermatocitos en cigotena y paquitena muestran un marcaje con  $\gamma$ -H2AX extendido en todo el núcleo (Fig. 54 A-D), tal y como ocurre en condiciones naturales. Un día después del tratamiento se observan núcleos de células en cigotena y paquitena con un marcaje más discreto de  $\gamma$ -H2AX y generalmente concentrado en un dominio nuclear (Fig. 54 E-H). En los espermatocitos teñidos con orceína acética, entre 1 y 12 días después de la irradiación con una dosis de 1Gy, observamos que el número y la localización de los quiasmas en metafase I no varían de lo descrito en situaciones naturales. Tan sólo se observan algunos efectos típicos de la irradiación, como constricciones en la cromatina. A raíz de estos datos podemos interpretar que la dosis de 1Gy no es suficiente para cambiar el patrón de recombinación recíproca descrito en los machos de la población de *S. grossum* analizada. A pesar de que la señal de  $\gamma$ -H2AX

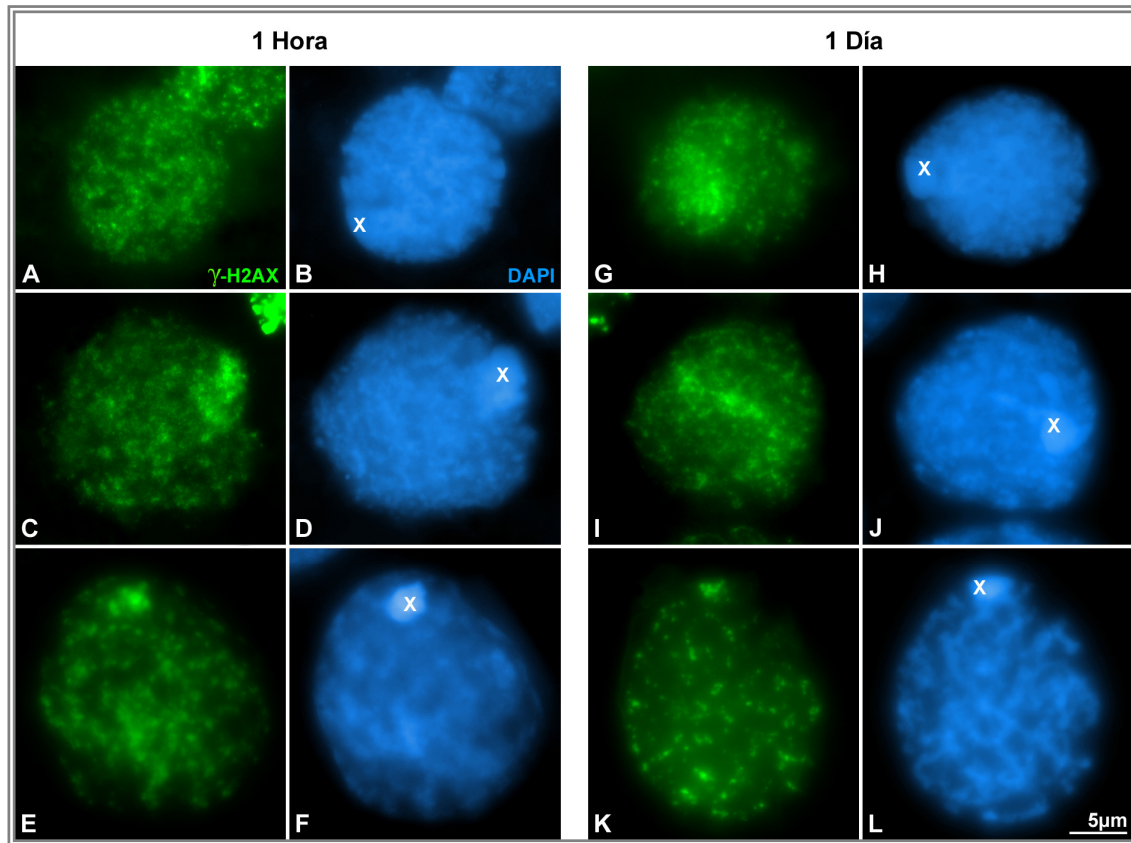


cubre todo el núcleo de forma inicial, lo que podría ser interpretado como que hemos inducido “DSB” en toda la cromatina.



**Figura 54.** Inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX (verde) en espermatocitos *S. grossum* de una hora y un día después de la irradiación gama con una dosis de 1Gy. La cromatina aparece teñida con DAPI en azul. El cromosoma X se señala sobre la cromatina. Todas las imágenes son el resultado de la suma de varios planos focales. (A y B) Cigotena una hora después de la irradiación. (C y D) Paquitena una hora después de la irradiación. En ambas células la señal de  $\gamma$ -H2AX se distribuye en toda la cromatina. (E y F) Cigotena un día después de la irradiación. (G y H) Paquitena un día después de la irradiación. El marcaje de  $\gamma$ -H2AX queda reducido a una región de la cromatina.

Al aumentar la dosis del tratamiento a 2.5Gy y 5Gy, comprobamos que una hora (Fig. 55 A-F) y un día (Fig. 55 G-L) después de la irradiación el 100% de los espermatocitos en estadios entre leptotena y paquitena muestran señal de  $\gamma$ -H2AX en todo el núcleo. Por lo tanto, consideramos que hemos inducido “DSB” en toda la cromatina. Un día después de la irradiación, en leptotena y cigotena se distingue alguna región del núcleo donde la intensidad de señal de  $\gamma$ -H2AX es mayor (Fig. 55 G-J), pero todo el núcleo presenta focos dispersos. Situación que contrasta con una situación natural, donde el marcaje  $\gamma$ -H2AX se polariza en un determinado dominio nuclear (comparar Figs. 48 y 55). Un dato curioso es que en las células irradiadas nunca observamos un marcaje en cordones de  $\gamma$ -H2AX, tal y como ocurre en células sin irradiar, sino que se distinguen focos de mayor o menor tamaño distribuidos por todo el volumen nuclear.



**Figura 55.** Inmunodetección de  $\gamma$ -H2AX (verde) en espermatocitos *S. grossum* de una hora y un día después de la irradiación gama con una dosis de 5Gy. La cromatina aparece teñida con DAPI (azul). El cromosoma X se señala sobre la cromatina. Cada una de las imágenes es la suma de distintos planos focales. (A-F) Espermatocitos una hora después de la irradiación. (A y B) Leptotena. (C y D) Cigotena. (E y F) Paquitenia. Todas las células muestran un marcaje de  $\gamma$ -H2AX homogéneo en toda la cromatina. (G-L) Espermatocitos un día después de la irradiación. (G y H) Leptotena. (I y J) Cigotena. (K y L) Paquitenia. Se distingue señal de  $\gamma$ -H2AX en todo el núcleo.

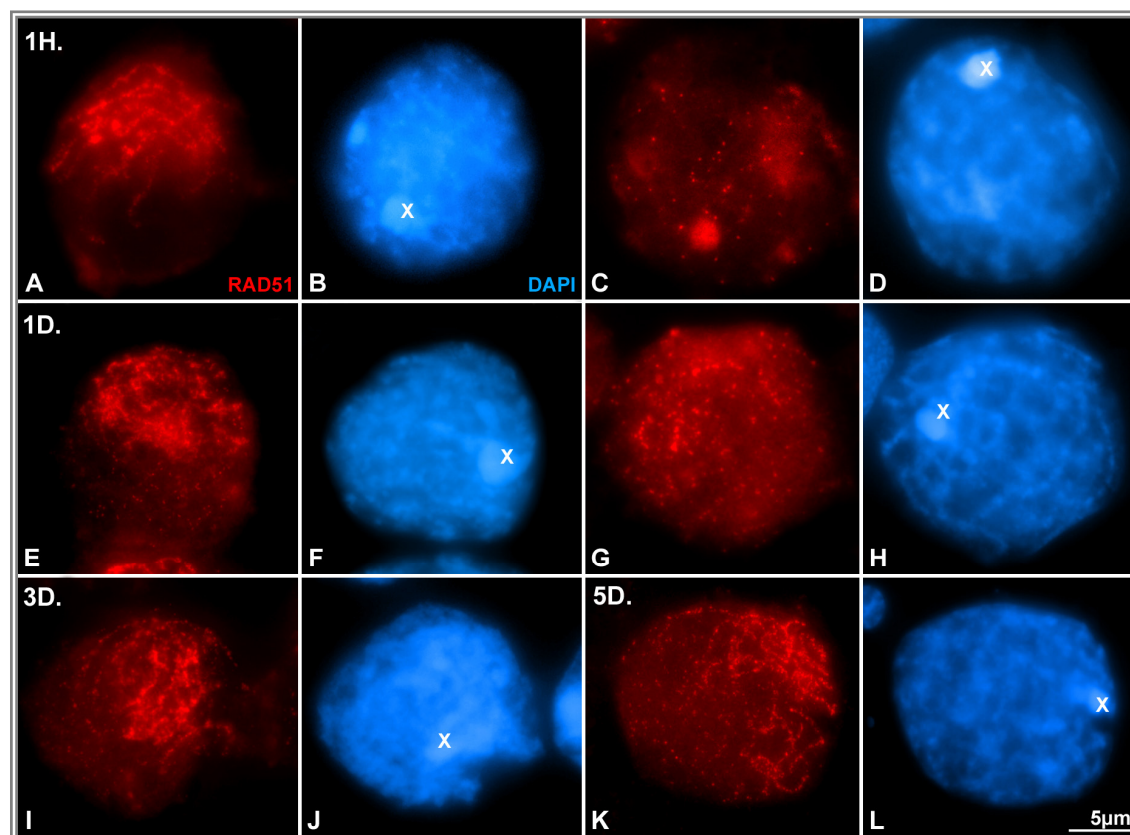
El estudio de aplastados de espermatocitos teñidos con orceína acética después del tratamiento con una dosis de 2.5 y 5Gy, refleja la presencia de bivalentes largos con dos quiasmas y tetravalentes entre el día 4 y 5. Este resultado indica un cambio en el patrón de recombinación recíproca. Este efecto es más frecuente en la dosis de 5Gy, donde el 77% de las células contabilizadas en los estadios de diacinesis o metafase I presentan algún bivalente largo biquiasmático o un tetravalente, frente al 23% en los individuos tratados con 2.5Gy. En un intento de saturar el sistema, se aplicaron dosis mayores a 5Gy, llegando hasta 10Gy. Sin embargo, los individuos no eran capaces de superar la barrera de los tres días de viabilidad. Por lo tanto, a la vista de los resultados la dosis de 5Gy es la más adecuada para el estudio. Los resultados descritos a continuación se refieren exclusivamente a esa dosis de irradiación sobre machos de *S. grossum*.

## 9. Efectos de la Irradiación Gamma en profase I.

### 9.1. Estudio de la incorporación de RAD51.

La incorporación de RAD51 se relaciona con los primeros pasos en la reparación de “DSB” por la vía de RH (Paull y col., 2000). Por lo tanto, quisimos comprobar si tras la inducción de “DSB” de forma artificial, RAD51 se incorpora en todos los lugares de rotura en el ADN en la meiosis de *S. grossum*. Mediante inmunolocalización de RAD51, una hora después de la irradiación se observa que el 100% de los núcleos entre leptotena y paquitena presentan focos de RAD51 polarizados en una región nuclear, observándose otro dominio del núcleo carente de señal (Fig. 56 A-D y Tabla 4). Dentro del dominio nuclear donde no se detectan puntos de RAD51, se encuentra el cromosoma X. Un día después de la irradiación, en el 100% de los espermatoцитos entre leptotena y paquitena se observa que la señal de RAD51 queda concentrada en una región nuclear, pero se distinguen focos discretos de RAD51 en el resto del núcleo, aunque en una menor proporción (Fig. 56 E-H). En este punto, debemos distinguir entre dos situaciones: señal polarizada y señal concentrada. Cuando nos referimos a señal polarizada queremos decir que todo el marcaje se localiza en un determinado dominio nuclear, quedando una región del núcleo carente de señal. Es lo que ocurre con  $\gamma$ -H2AX y RAD51 en los machos de *S. grossum* en situaciones naturales. Sin embargo, cuando hacemos referencia a una señal concentrada, queremos decir que el marcaje se localiza mayoritariamente en una región del núcleo, pero se distingue una pequeña señal en el resto. Cuando observamos la inmunolocalización de RAD51 en aplastados de espermatoцитos entre 3 y 5 días tras la irradiación, se distingue que la situación es similar a la observada en el día 1 (Fig. 56 I-L). En el 84% de las cigotenas a los 3 días y en el 90% a los 5 días, los focos de RAD51 se concentran en una región del núcleo, observándose algunos focos distribuidos por el resto de la cromatina. El 16% y el 10% restantes son difíciles de clasificar, distinguiéndose una amplia heterogeneidad en el tipo de señal de RAD51. Desde núcleos sin señal de RAD51, a núcleos con muy pocos focos aparentemente distribuidos al azar y con una intensidad variable. Debido a la alta heterogeneidad presentada y el bajo porcentaje que suponen este tipo de núcleos, hemos considerado conveniente no tenerlos en cuenta en el estudio. Por lo tanto, a la vista de estos resultados podemos inferir que tras una dosis de 5Gy de rayos gamma, la distribución de RAD51 no es

homogénea a pesar de que la señal de  $\gamma$ -H2AX sí se distingue en toda la cromatina (Fig. 57 A-D).



**Figura 56. Inmunolocalización de RAD51 (rojo) en *S.grosum* un tratamiento con 5Gy de rayos gamma.** Todas las imágenes son la suma de varios planos focales. El cromosoma X está señalado sobre la cromatina teñida con DAPI (azul). (A-D) Una hora (1H) después de la irradiación. (A y B) Cigotena. (C y D) Paquitena. (A y C) RAD51 se polariza en una región nuclear. (E-H) Un día (1D) después de la irradiación. (E y F) Cigotena. (G y H) Paquitena. (I-J) Cigotena tres días (3D) después de la irradiación. (K-L) Cigotena cinco días (5D) después de la irradiación. (E, G, I y K) RAD51 se concentra mayoritariamente en una región nuclear pero se detectan puntos en toda la cromatina.

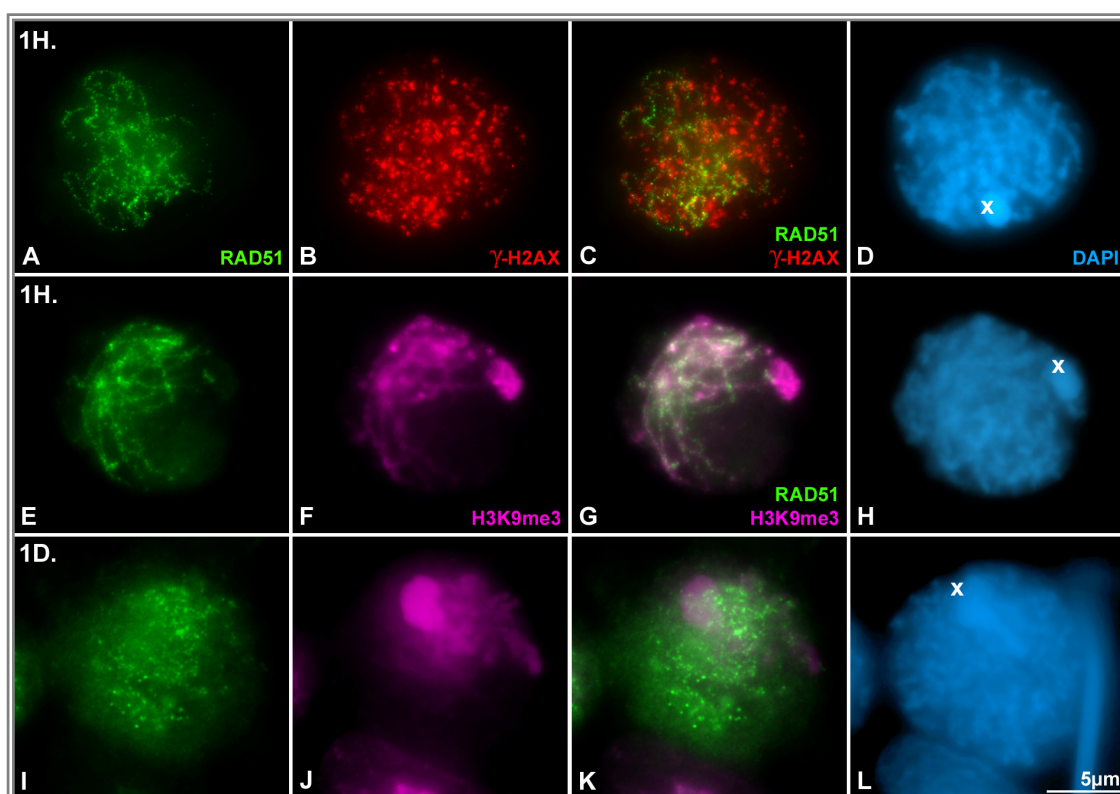
**Tabla 4: Señal de RAD51, comparación en espermatoцитos en condiciones naturales (sin irradiar) y espermatoцитos irradiados con 5Gy de rayos gamma.**

		Polarizada	Concentrada	n
Sin irradiar		100%		100
Tiempo tras irradiación	1Hora	100%		100
	1Día		100%	100
	3Días		84%	100
	5Días		90%	100

Relativo al marcaje de RAD51 hacemos distinción entre dos tipos de señales: polarizada y concentrada. En la primera, todos los focos se polarizan en una región, observándose un dominio nuclear carente de señal de RAD51. El marcaje denominado concentrado se caracteriza porque la mayoría de los focos se concentran en una región del núcleo, pero se distinguen discretos puntos de RAD51 en el resto. El 100% de los espermatoцитos sin irradiar y los que han sido irradiados hace 1 hora, presentan en los estadios entre leptotena y cigotena el primer tipo de señal. Un día después, todas las células se encuentran en el segundo caso, disminuyendo al 84% y al 90% 3 y 5 días respectivamente tras el tratamiento. El resto de las células en los días 3 y 5 no se incluyen dentro de ningún tipo específico de señal ya que la heterogeneidad observada es muy amplia.

## 9.2. La localización de RAD51 coincide con la polarización de H3K9me3.

Al observar que la incorporación de RAD51 tras los rayos gamma no se produce de forma homogénea, quisimos conocer si las regiones de la cromatina que incorporan mayoritariamente RAD51 coinciden o no con las regiones que presentan marcaje con H3K9me3. La doble inmunolocalización de H3K9me3 y RAD51 muestra que, aquellas regiones donde se detecta dicha modificación histónica son en las que se polariza la señal de RAD51 una hora después de la irradiación (Fig. 57 E-H) y donde se concentra RAD51 un día después (Fig. 57 I-L). Por lo tanto, inferimos que tras la irradiación, la incorporación mayoritaria de RAD51 ocurre en las regiones marcadas con H3K9me3, que por otro lado son aquellas regiones donde se producen las “DSB” endógenas en situaciones naturales (revisar Fig. 53).

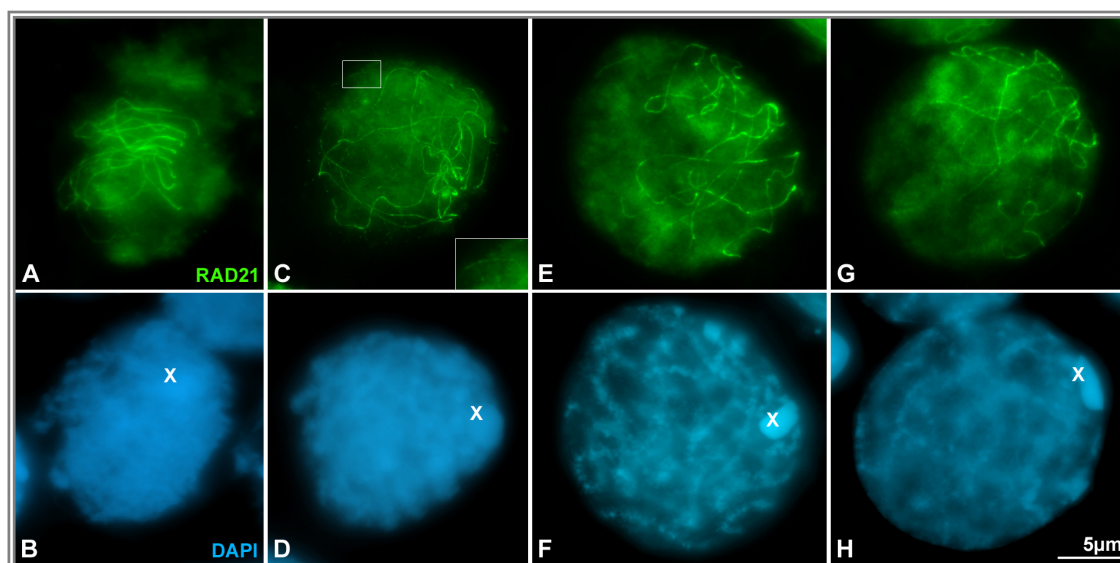


**Figura 57.** Doble inmunolocalización de RAD51 y  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 y H3K9me3 en espermatocitos de *S. grossum*. La cromatina se tiñó con DAPI y se muestra en azul. Se ha señalado el cromosoma X. Todas las imágenes son la suma de diferentes planos focales. (A-D) Doble inmunolocalización de RAD51 (verde) y  $\gamma$ -H2AX (rojo) una hora (1H) después de la irradiación con 5Gy. RAD51 se polariza en una región nuclear frente al marcaje homogéneo observado con  $\gamma$ -H2AX. (E-L) Doble inmunolocalización de RAD51 (verde) y H3K9me3 (fucsia) después de la irradiación con 5Gy. Una hora (1H) después (E-H) la señal de RAD51 y de H3K9me3 están polarizadas en la misma región nuclear. Un día (1D) después (I-L) el marcaje de H3K9me3 se polariza en un dominio nuclear sobre el cual se concentra la señal de RAD51.

### **9.3. Ausencia de sinapsis completa tras la irradiación.**

Otro punto importante del estudio de los efectos de los rayos gamma es el análisis de la sinapsis. La sinapsis incompleta observada en los machos de *S. grossum* en condiciones naturales es precedida por una restricción en la localización de “DSB” sólo sobre las regiones sinápticas. Para conocer si tras la radiación gamma se producen situaciones de sinapsis completa hemos utilizado un anticuerpo contra la cohesina RAD21. Esta cohesina se incorpora en la profase I meiótica de saltamontes en el momento y en los lugares donde ocurre la sinapsis (esta memoria). Observándose a partir de cigotena y estando ausente de regiones autosómicas que no sinapsan y el cromosoma X (Revisar apartados 2.3 y 6.3 para más información). Se analizaron individuos después de 2, 3, 4 y 5 días tras la irradiación y los resultados obtenidos muestran ausencia de sinapsis completa en todos los casos. Las paquitenas observadas no presentan filamentos de RAD21 distribuidos por todo el núcleo, como cabría esperar de una situación de sinapsis completa como la descrita en *L. migratoria* (esta memoria). Lo que se observa son núcleos donde los filamentos de RAD21 se localizan en una determinada región nuclear tanto en cigotena (Fig. 58 A-D) como en paquitena (Fig. 58 E-H). En cigotena media se observa una polarización de los extremos cromosómicos observados con RAD21, los cuales podemos identificar como los extremos sinápticos (Fig. 58 A). En núcleos en paquitena, se distingue que todos los filamentos de RAD21 se localizan en un dominio nuclear, observándose una región ausente de señal. Si nos fijamos con detenimiento y seguimos la señal de RAD21, la mayoría de esos filamentos presentan tan sólo uno de los extremos con aparente anclaje a la envoltura nuclear. Esta situación recuerda a lo descrito en una situación natural de sinapsis parcial en los machos de *S. grossum* (revisar Fig. 47). Si bien esto es cierto, no podemos dejar de mencionar que en ocasiones se observan algunas señales de RAD21, incluso definiendo líneas de puntos muy cortas (Fig. 47 C detalle). En ningún caso se observa señal de RAD21 en la cromatina del cromosoma X. A la vista de estos datos, inferimos que no se define una situación de sinapsis completa en los bivalentes autosómicos tras la irradiación con rayos gamma.





**Figura 58. Inmunolocalización de RAD21 (verde) después de la irradiación de machos de *S. grossum* con una dosis de 5Gy de rayos gamma.** Las imágenes que se muestran en la figura son la suma de diferentes planos focales. La cromatina está en azul por la tinción con DAPI. (A y B) Cigotena media dos días después de la irradiación. (C y D) Cigotena tardía dos días después de la irradiación. (E-H) Paquitenas tres días después de la irradiación. En todos los casos se distinguen filamentos de RAD21 en una única región nuclear. El detalle en C muestra una región fuera de la mayor concentración de filamentos de RAD21 donde se distingue una línea de puntos.

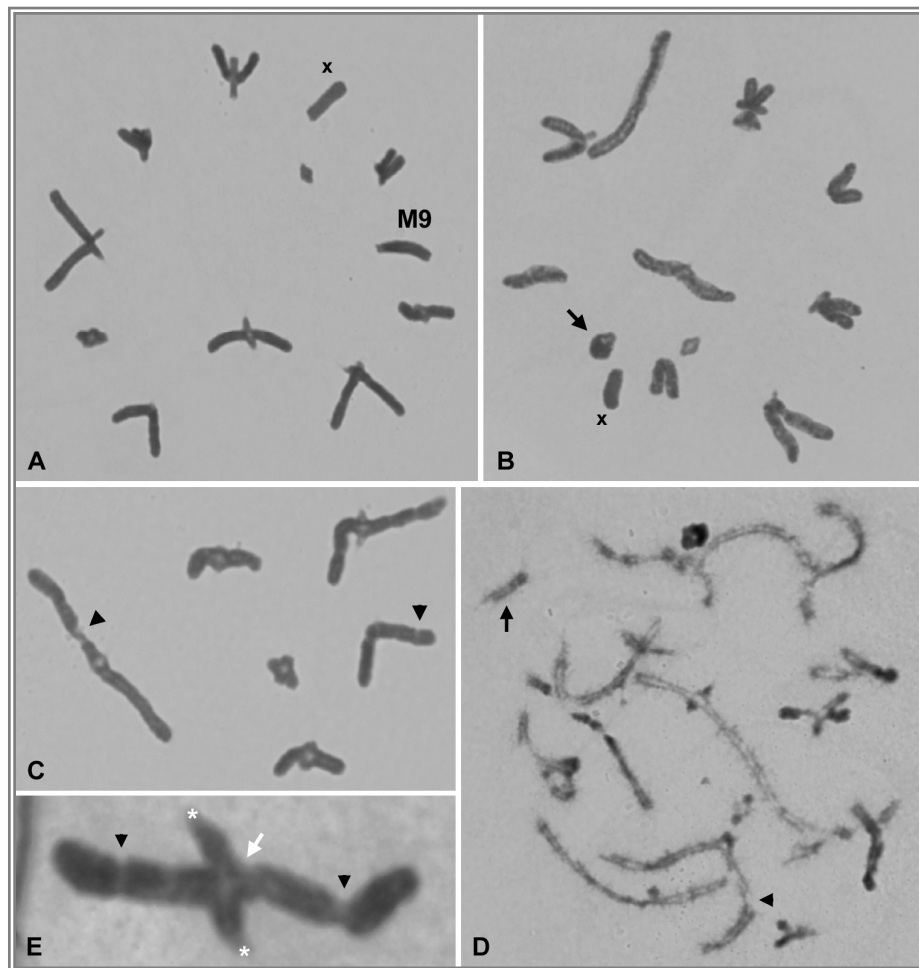
## 10. Efectos de la Irradiación Gamma en el número y localización de quiasmas.

Como se ha mostrado anteriormente, en condiciones naturales en metafase I los machos de *S. grossum* presentan un único quiasma por bivalente, excepto ocasionalmente el M9. Dicho quiasma único está localizado en posición proximal en los 8 bivalentes más largos del complemento (L1-M8), en concordancia con la región de sinapsis. Debido a este patrón de localización y número de quiasmas tan estricto, consideraremos que la irradiación gamma ha afectado a la recombinación recíproca si observamos variaciones en alguno de estos dos factores.

### 10.1. Efectos entre 1 y 3 días después la irradiación.

Entre los días 1 y 3 después del tratamiento con 5Gy, observamos una localización y frecuencia de quiasmas igual a la descrita en condiciones naturales. Así, se observan metafases I donde los 11 bivalentes presentan 1 único quiasma y donde el quiasma en los cromosomas L1-M8 tiene siempre localización proximal (Fig. 59 A y E). La única diferencia es que los cromosomas derivados del tratamiento de irradiación

presentan constricciones en los brazos cromosómicos y se visualizan roturas y fragmentos cromosómicos, presumiblemente acrocéntricos (Fig. 59 B y C). Estos daños son fácilmente observables en células en diacinesis, donde la cromatina no está condensada del todo (Fig. 59 D). Todos estos efectos deben derivar de roturas cromosómicas no reparadas convenientemente y han sido descritos anteriormente como efectos en el ADN tras tratamientos con rayos X (Klasterska y col., 1976). En ningún caso corresponden a cambios en el patrón de recombinación.



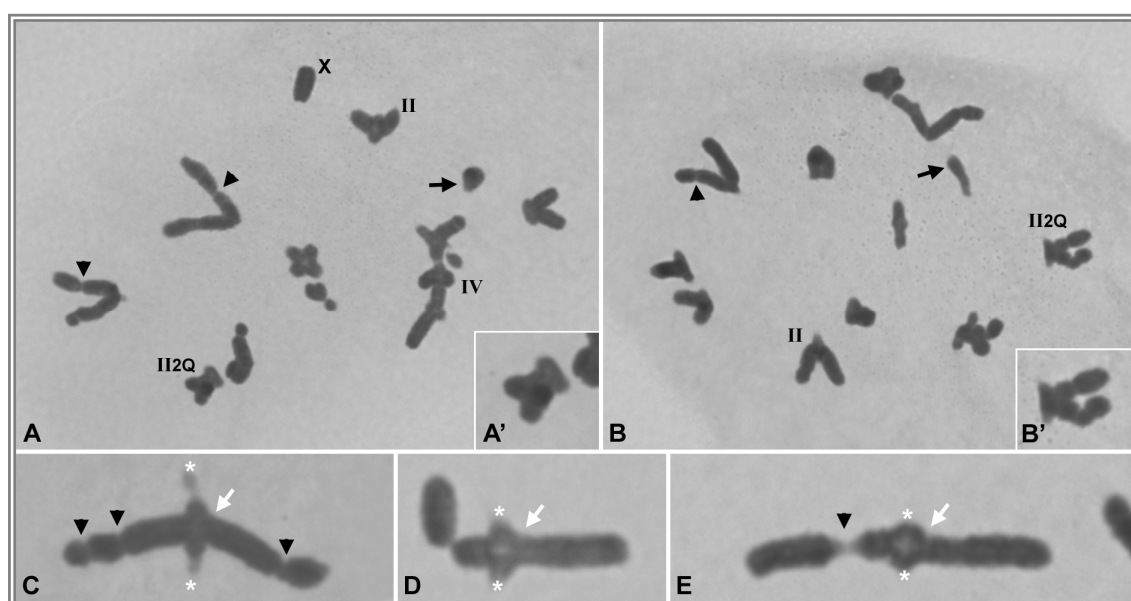
**Figura 59.** Tinción con orceína acética de espermatocitos de *S. grossum* entre 1 y 3 días después un tratamiento con 5Gy de rayos gamma. (A-C) Metafase I. (D) Diacinesis. (E) Detalle de un bivalente largo con un quiasma proximal (flecha blanca). Los asteriscos marcan la posición de los centrómeros. El cromosoma X está marcado en A y B. El cromosoma M9 está señalado en A. Las cabezas de flecha negra señalan constricciones en la cromatina. Las flechas negras marcan fragmentos cromosómicos.

## **10.2. Efectos a los 4 y 5 días después de la irradiación.**

En el día 4 y 5 después de la irradiación se observan las primeras evidencias de un cambio en el patrón de recombinación al detectar tetravalentes y bivalentes largos



con dos quiasmas. Estos tipos cromosómicos son sin embargo escasos a los 4 días, contabilizándose sólo 1 bivalente largo con dos quiasmas y 4 tetravalentes en metafase I en un único individuo. A los 5 días se agudizan los efectos, llegando a observarse 17 bivalentes largos biquiasmáticos y 19 tetravalentes (Fig. 60 A-B' y tabla 5). A los 5 días se analizaron además 200 bivalentes del tipo L1-M8 con un quiasma (Fig. 60 C-E) y se observaron 7 bivalentes M9 biquiasmáticos y 6 bivalentes con dos quiasmas que no supimos clasificar como M9 o uno de los 8 más largos del complemento (Tabla 5). Esto hace un total de 230 bivalentes analizados, en 75 células, 5 días después de la irradiación.



**Figura 60.** Tinción con orceína acética de espermatocitos de *S. grossum* cinco días después de la irradiación con una dosis de 5Gy de rayos gamma. (A y B) Metafase I. La X señala el cromosoma sexual. Se distinguen bivalentes largos con un quiasma proximal (II), tetravalentes (IV) y bivalentes con dos quiasmas (II2Q). Las cabezas de flecha negras identifican regiones de constricciones de la cromatina. Las flechas negras marcan fragmentos cromosómicos. (A' y B') Ampliación de los bivalentes con dos quiasmas de A y B respectivamente. (C, D y E) Bivalentes largos en metafase I con un quiasma proximal. (C) La posición del quiasma se marca con una flecha blanca y los centrómeros con asteriscos. Se distinguen tres constricciones en los brazos cromosómicos (cabezas de flecha negras). (D) Bivalente donde se observa una fractura de uno de los brazos cromosómicos. (E) Bivalente donde identificamos una constricción de la cromatina.

La localización del quiasma único analizado en los 200 bivalentes del tipo L1-M8 es siempre proximal (Fig. 60 C-E). Los 17 bivalentes biquiasmáticos L1-M8 presentan un quiasma en posición proximal y el otro en una posición que podemos denominar intersticial-subproximal (Fig. 61 A-E). Es importante destacar que nunca observamos un quiasma entre cromosomas homólogos con localización distal o subdistal. Este hecho es especialmente evidente en diacinesis, donde se observa fácilmente los lugares de

intercambio de material genético (Fig. 61 A-D). Los 19 tetravalentes observados en metafase I están formados por dos parejas de homólogos del tipo L1-M8, cada par de homólogos comparte un quiasma proximal y dos cromosomas no homólogos comparten un quiasma distal o subdistal (Fig. 61 F-K), al cual podríamos denominar quiasma ectópico, porque en situación normal nunca encontramos quiasmas distales en los cromosomas más largos del complemento (L1-M8). Al igual que en días anteriores, en los días 4 y 5 después del tratamiento se observan constricciones en la cromatina, fragmentos cromosómicos y bivalentes heteromorfos.

Tabla 5: Tipos cromosómicos en metafase I 5 días después de la irradiación.

Bivalentes (L1-M8) con 1 quiasma	200			
Bivalentes con 2 quiasmas	30	Largos (L1-M8)	17	Total: 230 bivalentes
		M9	7	
		¿?	6	
Tetravalentes	19			

De los 230 bivalentes contabilizados en metafase I, 200 presentan un único quiasma y 30 presentan 2 quiasmas. De esos 30, 17 eran largos, 7 el M9 y 6 no puede identificarse como M9 o uno de los largos. Además se han contabilizado 19 tetravalentes.

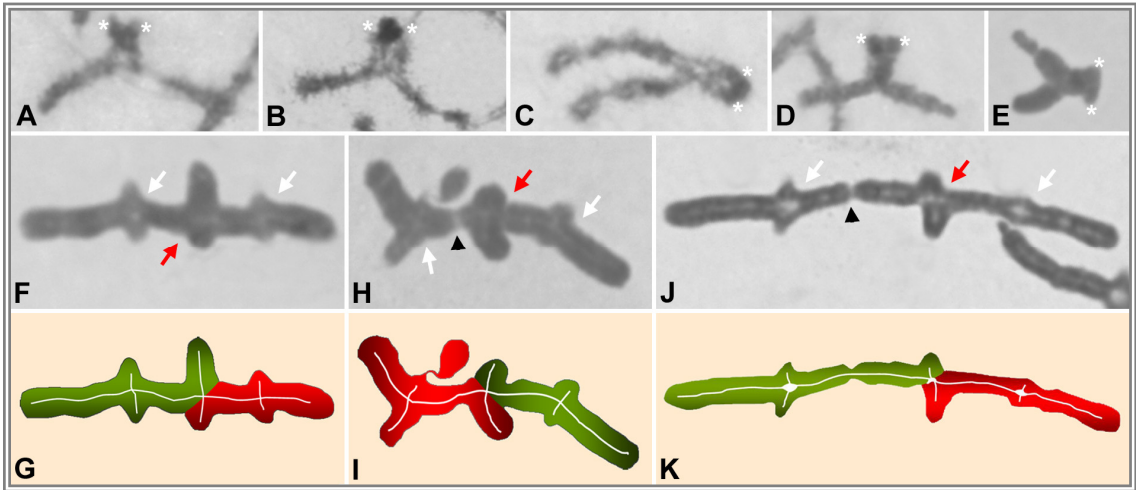
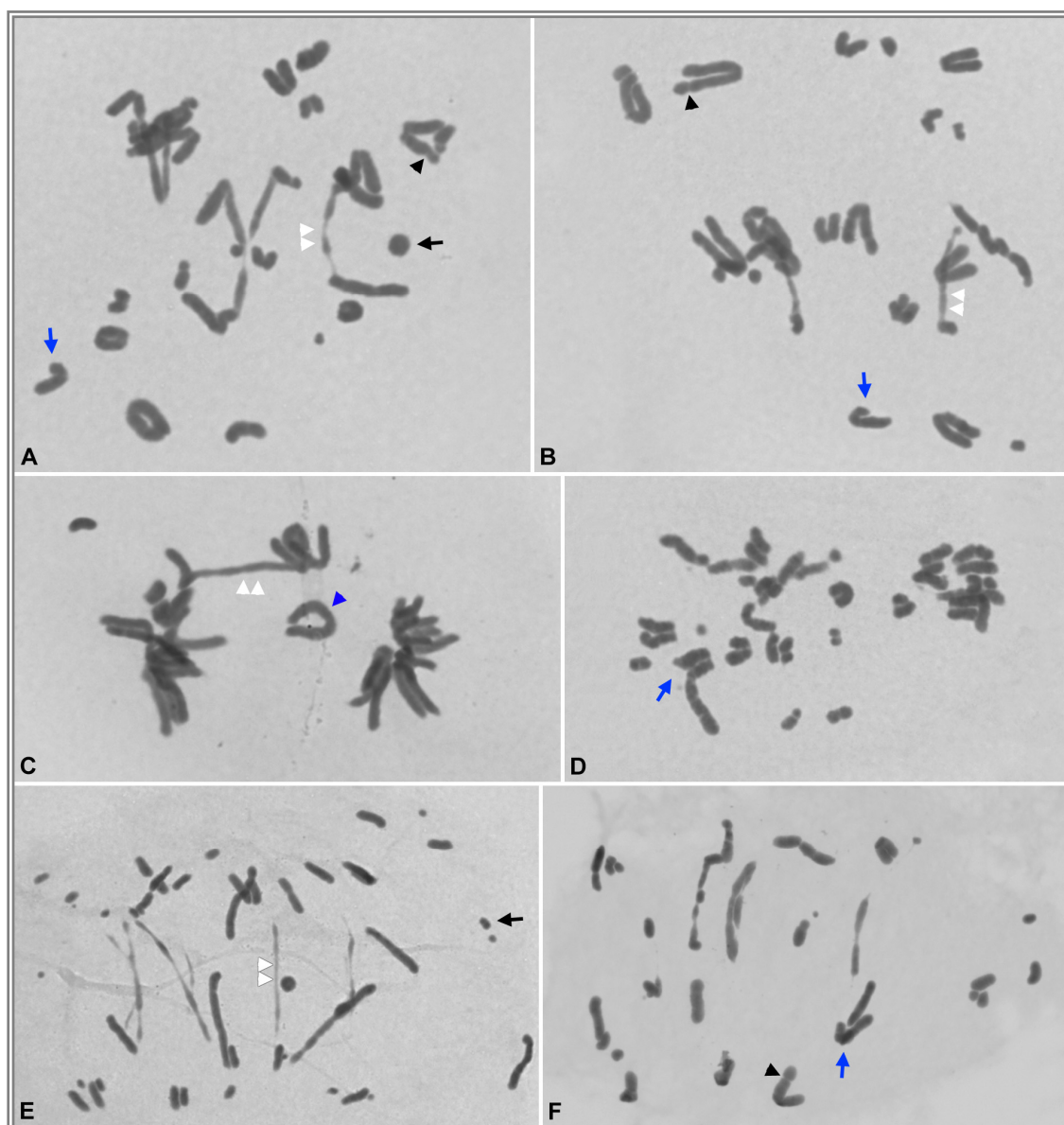


Figura 61. Efectos en cromosomas tipo L1-M8 de *S. grossum* cinco días después de la irradiación con una dosis de 5Gy de rayos gamma. Tinción con orceína acética. (A-D) Bivalentes con dos quiasmas en diacinesis. (E) Bivalente con dos quiasmas en metafase I. Los asteriscos marcan la posición de los centrómeros. (F-K) Tetravalentes (F, H y J), y esquemas de los tetravalentes (G, I y K). Cada tetravalente está formado por cuatro cromosomas, homólogos dos a dos. Una pareja de homólogos se representa en verde y la otra en rojo. En cada tetravalente observamos la presencia de un quiasma proximal entre cromosomas homólogos (flechas blancas) y un quiasma entre cromosomas no homólogos localizado en la región distal o subdistal (flechas rojas). Las cabezas de flecha negras indican constricciones en la cromatina.

El estudio de etapas posteriores a metafase I muestra además la existencia de puentes de cromatina en anafase I y anafase II (Fig. 62 A y E). De forma generalizada se visualiza una asincronía en la segregación, cromosomas que están segregando a la par que otros cromosomas que ya han segregado (Fig. 62 B), incluso se observan situaciones donde migran cromátidas y cromosomas a la vez (Fig. 62 B y F). Esto da lugar a cromosomas retrasados (Fig. 62 C). Además se observan configuraciones de metafase II donde el número cromosómico es mayor al esperado para esa etapa, lo que indica que se forman células no haploides tras la primera división meiótica (Fig. 62 D).



**Figura 62.** Tinción con orceína acética de espermatocitos de *S. grossum* cinco días después de la irradiación con una dosis de 5Gy de rayos gamma. (A y B) Anafase I. (C) Telofase I. (D) Metafase II. (E y F) Anafase II. Las cabezas de flecha negras indican constricciones de la cromatina. Las flechas negras señalan fragmentos cromosómicos y las azules cromosomas heteromorfos. Las cabezas de flecha blancas dobles marcan puentes de cromatina. Las cabezas de flecha azul indican cromosomas retrasados.

Además se han contado 30 cromosomas heteromorfos en metafase II y se ha observado un gran número de fragmentos cromosómicos. En todas las etapas de la meiosis es habitual observar constricciones en los brazos cromosómicos

Hemos analizado también el tipo de espermátidas, observando que el 98.6% eran normales, con una morfología típica de una espermátida haploide (Fig. 63 A), frente a un 1.4% que se contabilizaron como anormales o aberrantes (Fig. 63 B-D). Estos datos son muy similares a una situación control, donde el 98.5% de las espermátidas en un individuo sin irradiar presentan una morfología normal de una espermátida haploide, comúnmente denominada morfología lanceolada, las cuales se caracterizan por la presencia de un único adjunto centriolar (Dr. Julio S. Rufas, comunicación personal) y tienen una forma compacta desde la punta hasta el final de su estructura (Tabla 6). Sin embargo, cuando una espermátida adquiere una configuración aberrante, probablemente por descompensaciones cromosómicas, la figura que adopta es distinta, observándose que la base no acaba en una forma compacta e individualizada, sino que se divide en dos o más puntas y típicamente presentan más de un adjunto centriolar. En todo momento se hizo el cálculo teniendo en cuenta un tipo de espermátida con una maduración media.

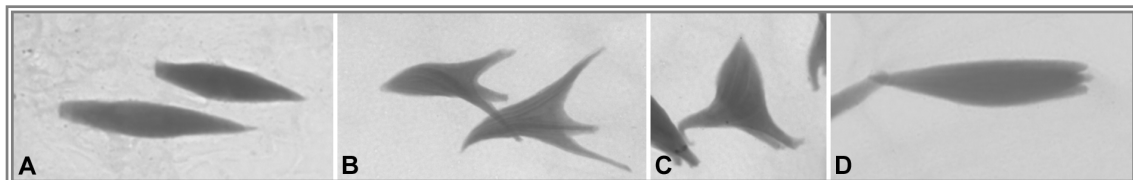
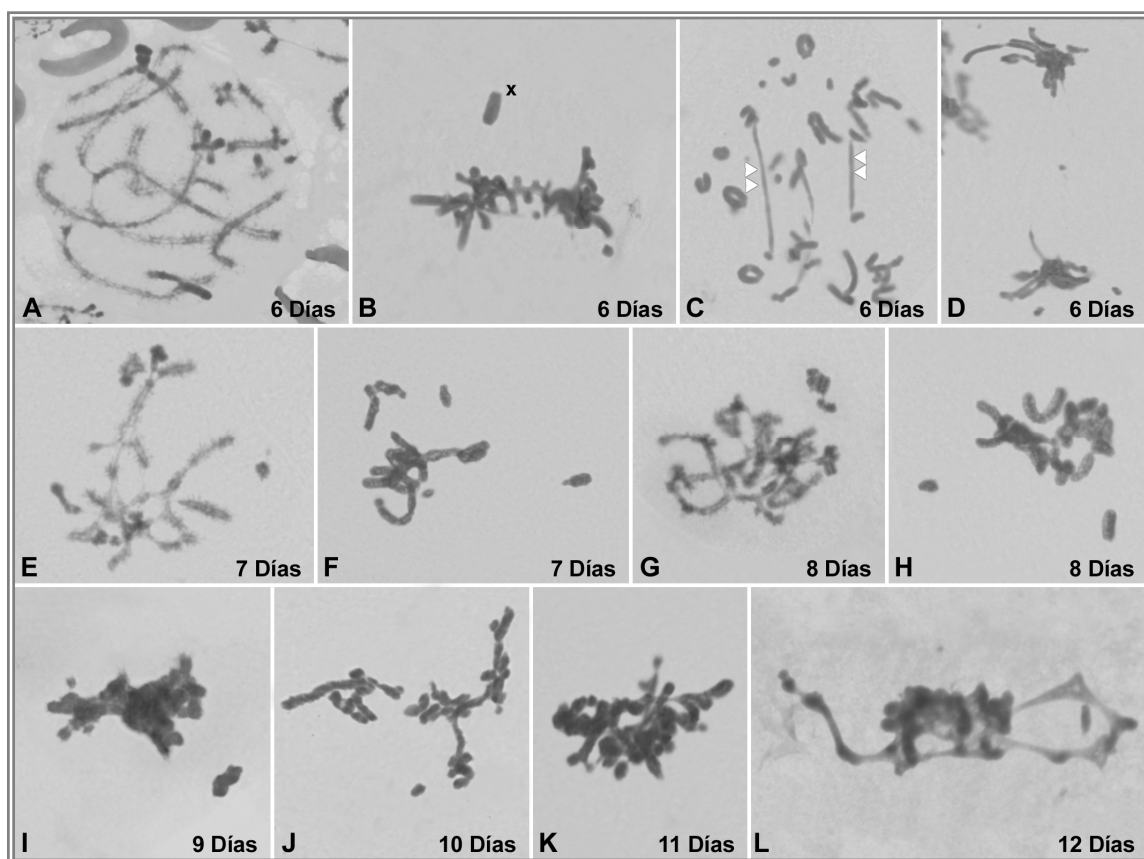


Figura 63. Tinción con orceína acética de espermátidas de *S. grossum* tras una dosis de 5Gy de irradiación gamma. (A) Espermátidas normales. (B) Espermátidas anómalas.

### **10.3. Efectos entre los días 6 y 12 tras la irradiación.**

A los 6 días después de la irradiación algunas diacinesis se muestran completas y mantienen la morfología cromosómica, observándose constricciones de la cromatina, roturas y asociaciones o fusiones cromosómicas (Fig. 64 A). Sin embargo, la mayoría de las células adquieren un aspecto “pegajoso” en su cromatina, los cromosomas forman agrupaciones complejas donde es imposible distinguir bivalentes individualizados, en lo que consideramos podrían ser metafase I por la configuración general y el grado de

compactación de la cromatina (Fig. 64 B). Ese aspecto de la cromatina ha sido descrito anteriormente como “*sticky chromatin*” (cromatina pegajosa), y es un efecto típico de los tratamientos de irradiación (Klasterska y col., 1976). Las anafases I presentan fallos en la segregación debido a la presencia de puentes de cromatina y fragmentos cromosómicos (Fig. 64 C y D). Entre los días 7 y 12 la situación es similar, de nuevo en alguna diacinesis 7 u 8 días después del tratamiento, se distinguen asociaciones o fusiones cromosómicas (Fig. 64 E y G). Pero en general el aspecto de la cromatina está tan afectado, que lo único que se identifica es una masa cromosómica, más o menos compacta, en la cual no podemos estudiar a los cromosomas de forma individualizada (Fig. 64 F, H-L).



**Figura 64.** Tinción con orceína acética de espermátocitos de *S. grossum* entre 6 y 12 días después de la irradiación con una dosis 5Gy de rayos gamma. El día en que se fijaron los testículos tras la irradiación gamma aparece señalado en cada imagen. (A) Diacinesis. (B) Metafase I. Sólo se identifica individualizado el cromosoma X. (C) Anafase I, donde se distinguen varios puentes de cromatina. (D) Telofase I. (E) Diacinesis. (F) Cromosomas condensados en metafase I. (G) Prometafase I. (H-L) Cromosomas condensados en metafase I. En todos los casos se observa una alta pegajosidad de la cromatina, haciendo difícil la identificación individualizada de los cromosomas.

Por otro lado, igual que en días anteriores, se hizo un recuento del tipo de espermátidas, contabilizándose que 96% de las espermátidas del día 6 presentan una morfología normal frente al 4% de espermátidas aberrantes. Este dato prácticamente no varía respecto a las contabilizadas el día 5 (Tabla 6). Al día 7 se observa un ligero aumento en las espermátidas aberrantes, representando el 30.8% del total. Sin embargo, es a partir del día 8 cuando se observa un mayor incremento de las espermátidas aberrantes, observándose que tan sólo el 14.7% presentan una morfología similar a lo esperado para una espermátida haploide. Este número de espermátidas normales se va reduciendo en días sucesivos, llegando a ser del 4% en el día 12.

**Tabla 6: Tipos de espermátidas.**

		Normales	Aberrantes	n
<b>Sin irradiar</b>		98.5%	1.5%	100
<b>Tiempo tras irradiación</b>	5 Días	98.6%	1.4%	100
	6 Días	96%	4%	100
	7 Días	69.2%	30.8%	100
	8 Días	14.7%	85.3%	100
	9 Días	25%	75%	100
	10 Días	5.4%	94.6%	100
	11 Días	7%	93%	100
	12 Días	3%	97%	100

A partir del día 7 tras la irradiación con 5Gy de rayos gamma se observa un incremento en el número de espermátidas aberrantes, en detrimento de las que presentan una morfología normal, similar a las observadas mayoritariamente en una situación sin irradiar.

A la vista de los resultados, es el día 5 después de la irradiación donde se observan los mayores efectos sobre el patrón de recombinación de la especie en metafase I. Sin embargo, los posibles errores en la segregación ocurridos probablemente a causa de la irradiación no se hacen evidentes en las espermátidas hasta el día 7 u 8.







## ***1. Dinámica y distribución de las Cohesinas en Saltamontes.***

### **1.1. Seguimiento del proceso sináptico mediante SMC3 y SMC1 $\alpha$ .**

La clasificación en etapas de la profase I está determinada por el ensamblaje y desensamblaje del CS. Habitualmente, en los estudios de meiosis se utiliza como marcador en profase I a la proteína SYCP3, ya que es uno de los componentes estructurales de los EA y EL del CS (Moens y col., 1987; Heyting, 1996; Parra y col., 2004a). La similar localización y distribución del eje de cohesina y los EA formados por SYCP2 y SYCP3 evidencian una estrecha relación entre ambas estructuras en mamíferos, dando lugar a estructuras de aspecto fibrilar en profase I (Parra y col., 2004b; Xu y col., 2004). Por otro lado, la detección previa de diferentes cohesinas, frente a los componentes de los EA (Eijpe y col., 2003; Prieto y col., 2004) parecen mostrar que el eje de cohesina se forma con anterioridad a los EA, pudiendo influir en su organización. En células meióticas de ratones deficientes en SYCP3, las cohesinas SMC3 y SMC1 forman ejes de cohesina, similares a las que forman en presencia de los componentes del CS, sugiriendo que la formación del eje de cohesina es independiente de SYCP3 (Pelttari y col., 2001). Los componentes de los EA y del complejo de cohesina en mamíferos están relacionados hasta tal punto, que se considera que SMC3, SMC1 $\beta$ , STAG3 y REC8 podrían estar formando parte de los EA e influir en su morfogénesis (Eijpe y col., 2000; Prieto y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Revenkova y Jessberger, 2005). Nuestros resultados en saltamontes muestran ejes de cohesina formados por SMC3 y SMC1 $\alpha$  desde leptotena. Estos ejes se asocian por parejas en cigotena y en paquitena dan lugar a 11 filamentos autosómicos, correspondientes a los 11 bivalentes, más un filamento corto y delgado localizado sobre la cromatina del univalente sexual (Figs. 10 y 11 de resultados). Este proceso recuerda a la formación de los EA/EL de los cromosomas. Estas evidencias y los antecedentes descritos, nos permiten concluir que la inmunodetección de las cohesinas SMC3 y SMC1 $\alpha$  es una herramienta válida para el seguimiento de la sinapsis, en espermátocitos de saltamontes y podríamos identificar su localización con la de los EA/EL de los cromosomas.

Una vez finalizada la paquitena, en diplotena, el CS comienza a desensamblarse. En mamíferos los EL se separan, disociándose proteínas de los FT como la SYCP1 (Moens y Spyropoulos, 1995; de la Fuente y col., 2007), pero la SYCP3 se mantiene

incluso hasta metafase I (Parra y col., 2004b; de la Fuente y col., 2007). Se ha detectado que la variante meiótica SMC1 $\beta$  y la cohesina SMC3 permanecen durante toda la división meiótica, incluso después del desensamblaje del CS. No así SMC1 $\alpha$ , que se detecta sólo hasta diplotena (Revenkova y col., 2001). En saltamontes se ha observado que en etapas de diplotena, el CS se fragmenta completamente (Rufas y col., 1992), pero nuestros resultados muestran que las cohesinas SMC3 y SMC1 $\alpha$  permanecen en diplotena y diacinesis (Figs. 12 y 13 de resultados). Gracias a la tinción con DAPI identificamos los núcleos en diplotena y observamos que los ejes de SMC3 y SMC1 $\alpha$  presentan una singular configuración que hemos denominado “alambre de espino”, debido a las excrescencias que aparecen en su recorrido. Por su parte, en diacinesis comenzamos a ver los bivalentes ligeramente individualizados por el progreso de la condensación y las cohesinas se detectan en el dominio intercromatídico de los cromosomas (Figs. 12 y 13 de resultados). Por lo tanto la inmunolocalización de SMC3 (Valdeolmillos y col., 2007) y SMC1 $\alpha$  sirve como marcador de todas las etapas de la primera profase meiótica.

## **1.2. Sinapsis parcial en *S. grossum*: inferencias desde el eje de cohesina**

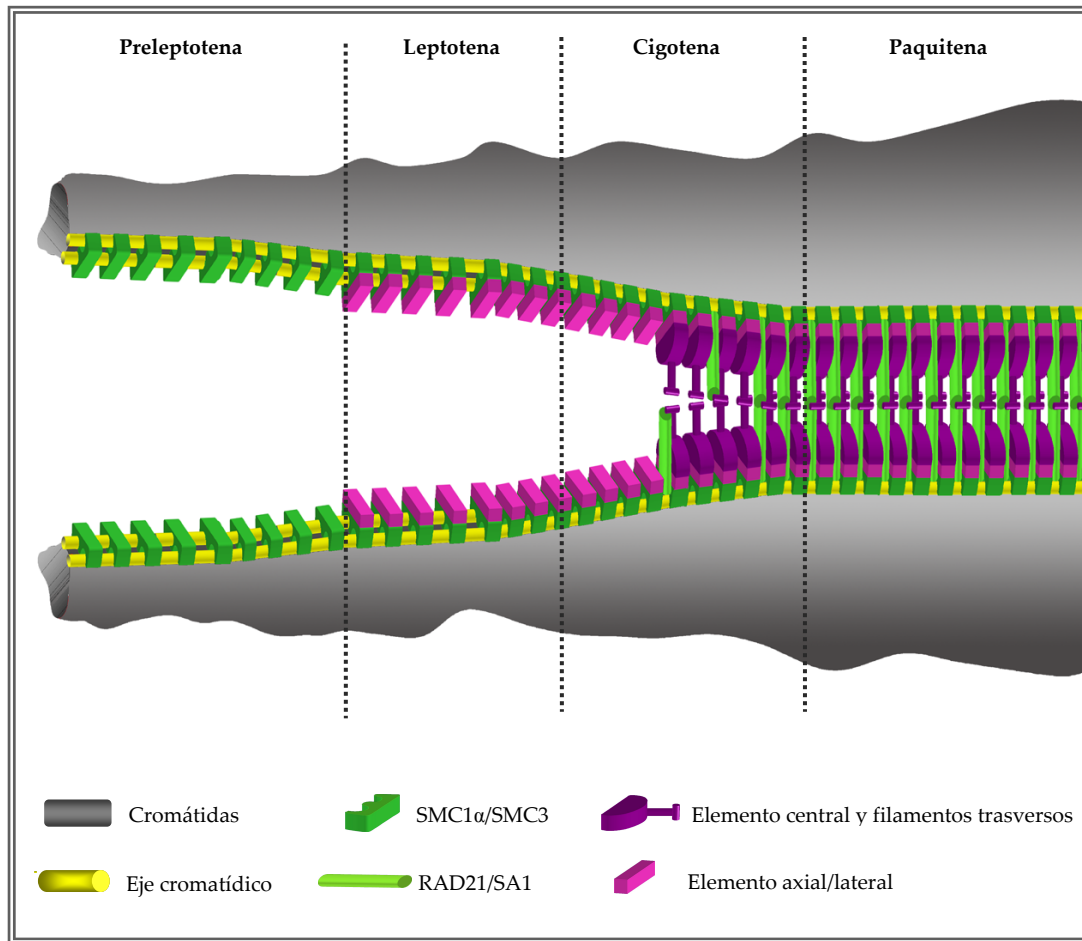
Debido a las especiales características de los machos de *S. grossum*, donde los bivalentes L1-M8 son parcialmente asinápticos (Jones, 1973; Fletcher, 1977), hemos considerado necesario realizar un apartado donde analicemos la progresión de los ejes de cohesina en la profase I y su relación con la sinapsis. Cuando analizamos los espermatocitos de *S. grossum* tras la inmunolocalización de SMC3 observamos que la maduración del eje de cohesina desde preleptotena hasta cigotena, no es uniforme en todo el volumen nuclear (Fig. 43 de resultados). En paquitena distinguimos 3 filamentos gruesos de SMC3, un filamento fino correspondiente al cromosoma X y 8 filamentos de SMC3 gruesos hasta un punto, donde se bifurcan en dos más finos y se dispersan en el núcleo (Fig. 44 de resultados). Estos resultados evidenciarían la especial situación sináptica de la especie. Por lo tanto, deducimos que los 3 filamentos gruesos corresponden los cromosomas M9, S10 y S11, el filamento fino correspondería al eje de cohesina del cromosoma X asináptico y los 8 autosómicos restantes serían los bivalentes L1-M8 que presentan sinapsis parcial, restringida a la región proximal. Sin embargo, a

pesar de visualizarse una maduración no uniforme del eje de cohesina, la inmunolocalización de SMC3 también permite seguir la progresión sináptica en *S. grossum*. Además, de estos resultados se deduce que aquellas regiones que exhiben una maduración tardía del eje de cohesina son las que no presentan sinapsis en paquitena (Calvente y col., 2005). Una diferente maduración de los ejes de cohesina, observada a la par que la sinapsis incompleta, se ha descrito en los machos de *P. meridionales*. Esta especie de saltamontes, presente en poblaciones naturales de la provincia de Toledo, muestra sinapsis parcial, localizada en este caso en las regiones distales no centroméricas de los bivalentes (Viera y col., 2009b). Del estudio de la distribución de SMC3 y SMC1 $\alpha$  mediante inmunolocalización en espermatoцитos de *P. meridionalis* se infiere un patrón de maduración no homogénea del eje de cohesina, similar a lo que hemos descrito en *S. grossum*. Si tal y como hemos inferido anteriormente, esa formación del eje de cohesina, por tiempo, morfología y posición, podría estar relacionada con la formación de los EA, podríamos pensar que en los machos de *S. grossum* la maduración de los EA tampoco sería uniforme.

### **1.3. Detección secuencial de las cohesinas en profase I**

El análisis comparativo de la inmunolocalización de las cohesinas SMC y las no SMC incluidas en este estudio, muestra una dinámica diferente en cuanto al momento de su detección durante la profase I. Mientras SMC1 $\alpha$  y SMC3 están presentes desde preleptotena y marcan estructuras fibrilares desde leptotena (Fig. 10 y 11 de resultados), RAD21 y SA1 no son detectadas hasta cigotena en los lugares de inicio de sinapsis, tanto en aplastado como en esparcido (Fig. 16 y 20 de resultados). La idea de una dinámica distinta entre las cohesinas SMC y RAD21 y SA1 está reforzada por estudios previos de inmunoprecipitación en *D. melanogaster*, donde se sugiere que RAD21 y SA1 están asociadas entre ellas más estable de lo que lo están con las proteínas SMC del complejo de cohesina (Vass y col., 2003). En nuestro caso, tras diferentes ensayos de inmunoprecipitación con extracto proteico de testículo de saltamontes, no hemos podido discernir si existe alguna asociación más estable que otra entre las diferentes cohesinas estudiadas. Con los datos que tenemos actualmente no podríamos saber si RAD21 y SA1 se incorporan en cigotena como parte de un complejo de cohesina

completo o como subunidades independientes. O bien si dichas cohesinas están en etapas anteriores y sólo tras la progresión de la sinapsis y la incorporación del EC y los FT del CS son observables bajo nuestras condiciones de trabajo. En cualquier caso, las evidencias mostradas han permitido generar un modelo de trabajo de incorporación secuencial de las cohesinas en la meiosis de saltamontes (Fig. 65) (Valdeolmillos y col., 2007).



**Figura 65: Modelo de la carga secuencial de cohesinas en profase I de saltamontes (adaptado de Valdeolmillos y col., 2007).** Sobre la base de los ejes cromatídicos (pieza amarilla), localizados en la base de los bucles de cromatina, se forma en preleptotena el eje de cohesina donde están presentes al menos SMC3 y SMC1α (piezas verde claro) en saltamontes. Sobre ese eje de cohesina se acoplarían las proteínas de los EA/EL (piezas rosas). Simultáneamente al ensamblaje del CS por la incorporación del EC y los FT (piezas moradas) y la progresión de la sinapsis, podrían incorporarse nuevas cohesinas o complejos de cohesina, los cuales contendrían al menos a SA1 y RAD21 (piezas verde oscuro).

El modelo, generado en nuestro laboratorio sugiere que SMC3 está presente desde preleptotena, en *L. migratoria* y *E. plorans*, formando ejes de cohesina en los cromosomas. Ahora, sabemos que también la cohesina SMC1α presenta ese mismo patrón en profase I y que además encontramos que, en especies con sinapsis incompleta

como *S. grossum*, las cohesinas SMC tiene una localización similar en profase I. Sobre ese eje de cohesina inicial se ensamblarían los EA en leptotena y sólo cuando y donde comienza la sinapsis se incorporarían RAD21 y SA1. Este modelo también tiene en cuenta la organización del cromosoma en meiosis e incluye que los ejes de cohesina se organizarían sobre la base del eje cromatídico (“scaffold”), el cual en saltamontes tiene en las primeras etapas de la meiosis una posición lateral respecto a la cromatina (Rufas y col., 1992). Sin embargo, debemos destacar que sólo aquellas regiones donde se detecta sinapsis en *S. grossum* en paquitena son las que presentan una dinámica en profase I similar a lo esperado para la formación de los EA.

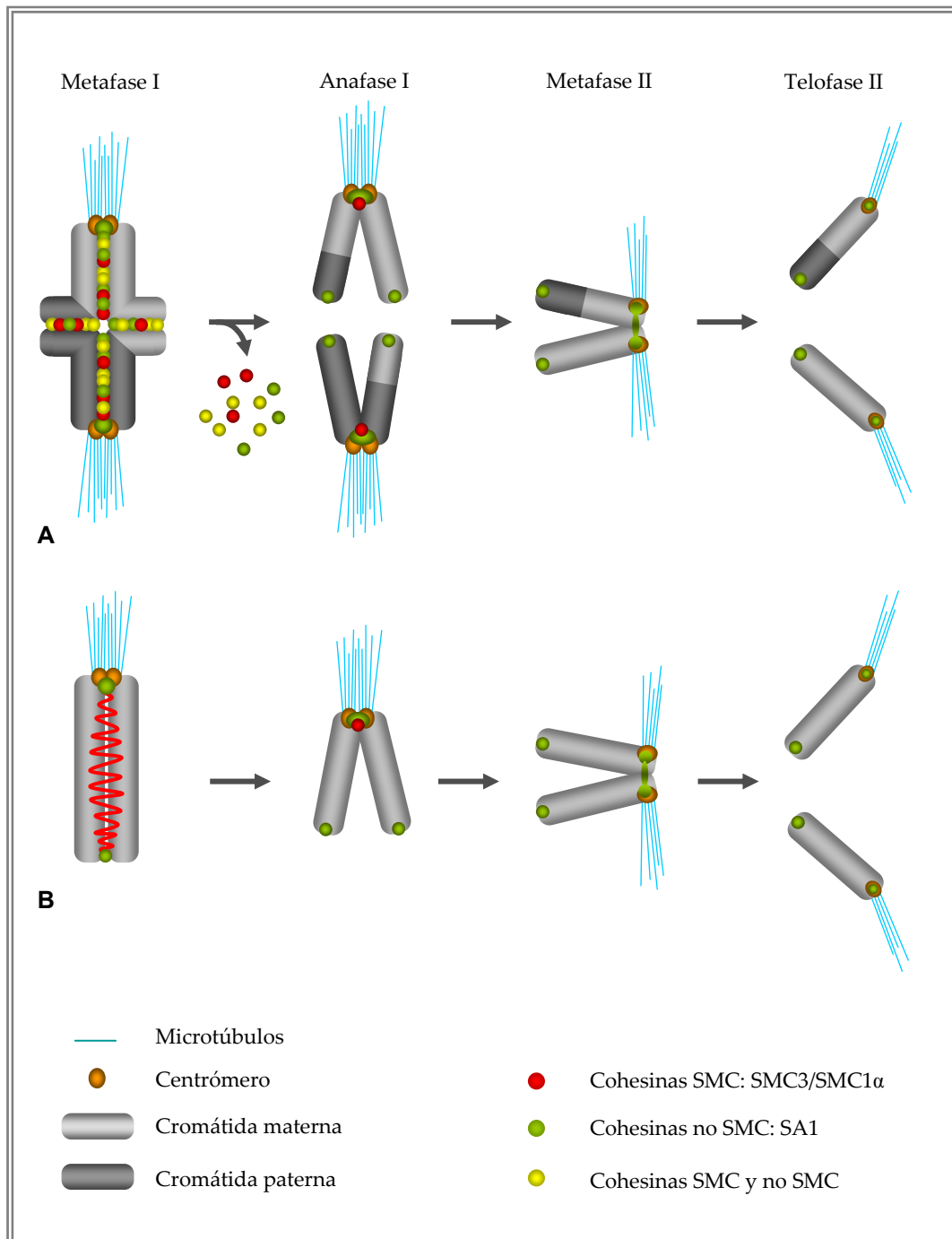
#### **1.4. Distribución de las cohesinas desde metafase I hasta telofase II.**

La localización de SMC3, SMC1 $\alpha$ , RAD21 y SA1 en metafase I en el dominio intercromatídico de los cromosomas es la esperada, dada la función que se le atribuye a estas proteínas en el mantenimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas (Eijpe y col., 2000). Cuando observamos detenidamente el marcaje de cada una de las cohesinas estudiadas en aplastados, nos damos cuenta de que su señal está distribuida a parches, muy cercanos unos de otros, conformando un aspecto lineal con engrosamientos en vista frontal (Figs. 15, 17, 22, 27, 28 y 46 de resultados) y ocupa gran parte del espacio entre ambas cromátidas hermanas, lo cual es especialmente evidente cuando vemos un bivalente con sinapsis completa en vista lateral tras su reconstrucción tridimensional (Video 13 y 17 del material suplementario ofrecido en CD). Una distribución a parches del complejo de cohesina en el dominio intercromatídico ha sido observada en ratón, donde se ha visto que las subunidades de cohesina SMC1 $\beta$ , REC8, RAD21, SMC3 y el parólogo de SA1 en mamíferos, STAG3, presentan una distribución similar en espermatoцитos en metafase I (Prieto y col., 2001; Kouznetsova y col., 2005; Suja y Barbero, 2009). Además, hemos observado que en el cromosoma X de las tres especies analizadas y en las regiones asinápticas de los bivalentes L1-M8 de *S. grossum* la distribución de las cohesinas SMC recuerda a un zigzag y no hemos detectado en su dominio intercromatídico a las cohesinas no SMC (Figs. 66 y 67). En metafase I observamos además que la cohesina SA1 se acumula en las regiones centroméricas de todos los cromosomas (Fig. 17 de resultados). No así RAD21 ni las cohesinas SMC

estudiadas en esta memoria (Fig. 15 y 22 de resultados). La acumulación de SA1 en los centrómeros no es un dato novedoso, ya que en extractos de *X. laevis* la proteína XSA1 se detectó entre las cromátidas hermanas y se enriquece en la región centromérica (Losada y col., 2000). De igual forma, en *D. melanogaster* DSA1 es parte del complejo de cohesina implicado en la cohesión entre los brazos cromosómicos y persiste en la heterocromatina centromérica en mitosis (Valdeolmillos y col., 2004). Por su parte, el parálogo de SA1 en mamíferos, la cohesina STAG3, se localiza a parches en el dominio intercromatídico de los bivalentes en meiosis y aunque no se observa una acumulación tan intensa como la de SA1 en saltamontes en la región centromérica, sí se sabe que está presente en el dominio interno del centrómero (Prieto y col., 2001).

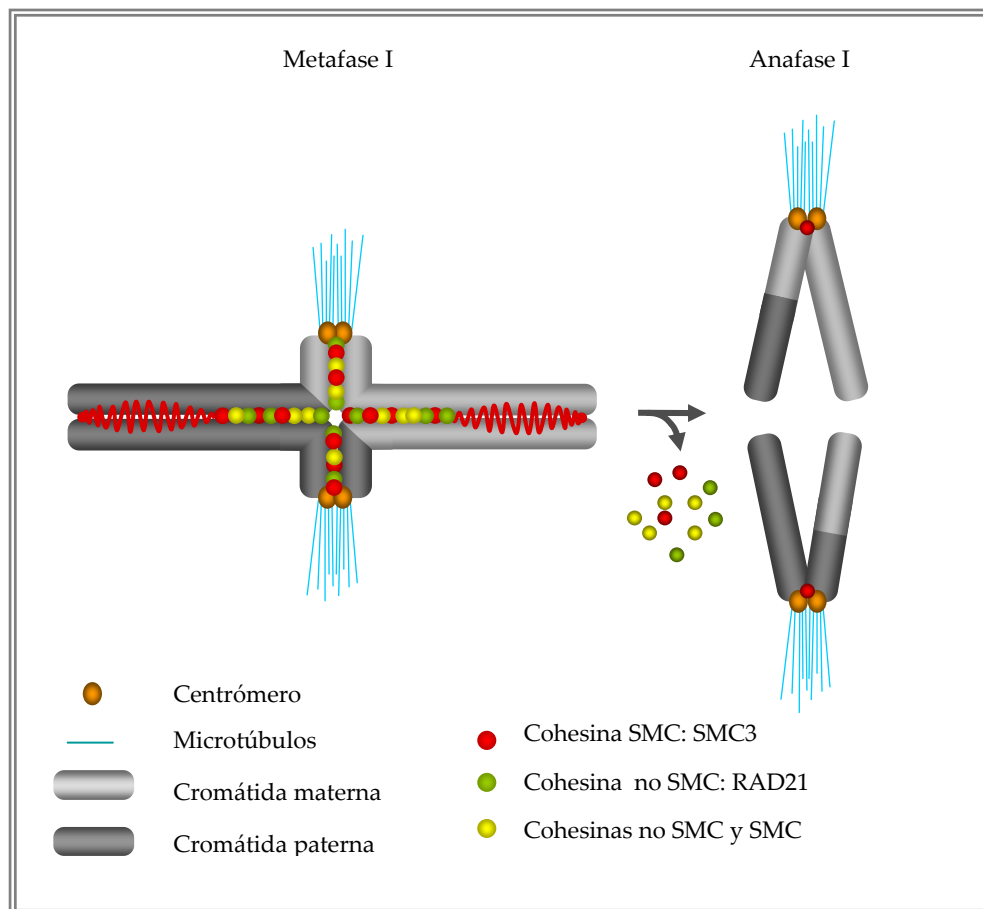
Continuando con el progreso de la meiosis, la cohesión braquial se libera en la transición metafase I – anafase I, siendo necesario el mantenimiento de la cohesión centromérica hasta metafase II y liberándose en la transición metafase II – anafase II. Así se ha mostrado en mamíferos y levaduras (revisado en (Watanabe, 2005; Suja y Barbero, 2009). En saltamontes hemos observado que SMC3, SMC1 $\alpha$ , RAD21 y SA1 se liberan de los brazos cromosómicos en la transición metafase I – anafase I, permitiendo la segregación de cromosomas homólogos (Fig. 23 de resultados y Fig. 66 y 67). En anafase I y telofase I se observan las cromátidas hermanas separadas pero unidas en el extremo centromérico, indicando que, al igual que en levaduras y en mamíferos, la cohesión braquial se libera en la primera división meiótica, quedando a nivel de centrómeros. En anafase I y telofase I hemos detectado la presencia de SMC3, SMC1 $\alpha$  y SA1 bajo el centrómero, cuya localización podemos distinguir no sólo por la orientación de los cromosomas, sino también por la tinción con DAPI. En ratón, se ha detectado la presencia de RAD21 en telofase I, cuya señal se ha descrito como barras en la región centromérica (Parra y col., 2004b). Sin embargo, nosotros no hemos observado este tipo de señales en saltamontes. Estas diferencias en el tipo de señal podrían derivar simplemente de diferencias en la organización centromérica y/o cromosómica entre ambos organismos. La liberación de la cohesión durante la meiosis esta mediada por la separasa, una proteasa específica de cisteína que rompe la subunidad de cohesina SCC1/RAD21/REC8, la cual ha sido fosforilada previamente, desestabilizando la integridad del complejo de cohesina y permitiendo su disgregación. La separasa

permanece inactiva hasta el inicio de la anafase por su inhibidor denominado securina (Uhlmann y col., 1999; Zou y col., 1999). El mantenimiento de la cohesión en el centrómero hasta metafase II depende de que los complejos de cohesina, en esa región del cromosoma, estén protegidos frente a la actividad de la separasa.



**Fig. 66:** Distribución de las cohesinas en bivalentes con sinapsis completa (A) y el cromosoma X (B) desde metafase I hasta anafase II. Vista frontal. Pos simplificar no se muestra la señal de RAD21, pero su distribución se limita al dominio intercromatídico de los bivalentes y se libera completamente en la transición metafase I – anafase I.

En levaduras y mamíferos se han identificado dos proteínas protectoras denominadas shugoshinas, Sgo1 (SGOL1) y Sgo2 (SGOL2) (Kitajima y col., 2004; Gómez y col., 2007). Éstas proteínas median la incorporación de la proteína PP2A, una fosfatasa que bloquea la fosforilación necesaria para eliminar la cohesión (Kitajima y col., 2006; Riedel y col., 2006). SGOL2 en la meiosis de ratón se localiza en el dominio interno del centrómero, una posición similar ha sido observada para su ortólogo Sgo2 en levaduras de fisión (Kitajima y col., 2004; Rabitsch y col., 2004; Gómez y col., 2007).



**Fig. 67: Distribución de las cohesinas en los bivalentes L1-M8 de *S. grossum* en metafase I y anafase I.** Vista frontal. En etapas posteriores a telofase I no se detecta ninguna cohesina en los cromosomas de esta especie.

En saltamontes no tenemos datos de la existencia ni de este tipo de proteínas, pero dada la importancia de la cohesión en centrómeros hasta la segunda división meiótica y la presencia de diferentes subunidades de cohesina en la región centromérica en anafase I, podríamos pensar que un mecanismo similar de protección en el centrómero debería ocurrir en las especies analizadas en esta memoria. Por otro lado, la



pérdida total de RAD21 en la transición metafase I – anafase I hace pensar que esta cohesina, a diferencia de lo que ocurre en ratón, no estaría implicada en la cohesión centromérica en saltamontes.

Cuando analizamos cromosomas en metafase II en saltamontes, observamos que SA1 se acumula en los cinetocoros y se detecta además una banda o un punto entre ambos, no así SMC3 ni SMC1 $\alpha$ , las cuales no hemos podido detectar más allá de telofase I. La no detección de una proteína tras su inmunolocalización, no implica la ausencia de ésta. Dado que en la actualidad no se conoce ningún complejo de cohesina donde SMC3 y SMC1 estén ausentes, consideramos que dichas cohesinas, o alguna isoforma, deben permanecer en la segunda división en saltamontes, aunque nosotros no hayamos podido detectarlas. Quizá la técnica, el protocolo empleado o la especificidad y pureza de los anticuerpos, sea una limitación en algunos casos. En ratón y bajo la técnica de esparcido se ha detectado la presencia de SMC1 $\beta$ , REC8, SMC3 y RAD21 en los centrómeros hasta metafase II (Revenkova y col., 2001; Eijpe y col., 2003; Lee y col., 2003; Xu y col., 2004). La presencia de REC8 sí se ha corroborado en nuestro laboratorio en aplastados de espermátocitos de ratón en metafase II, gracias al análisis de ratones portadores de un transgen REC8-*myc* (Rocío Gómez, comunicación personal), no así para RAD21 (Parra y col., 2004b) ni STAG3 (Prieto y col., 2001) ni SMC3 (Rocío Gómez, comunicación personal). REC8 tampoco se detecta en maíz en metafase II, ni RAD21 en *S. cerevisiae* (Hamant y col., 2005; Kateneva y col., 2005). En levaduras, también se ha detectado la presencia de REC8 en los centrómeros de cromosomas en metafase II (Watanabe, 2004). Por lo tanto, se ha propuesto que al menos REC8 estaría participando en la cohesión en la segunda división meiótica en mamíferos y levaduras. A la vista de nuestros resultados consideramos que quizá al menos SA1 tendría ese papel en saltamontes. La señal de SA1 en saltamontes evoluciona desde una intensa acumulación en el centrómero de los cromosomas en metafase I, pasando por una banda al inicio de la anafase I, a distinguirse dos puntos muy juntos en anafase I tardía. (Fig. 19 de resultados). Señales centroméricas de ese tipo se han observado en esta y otras especies de saltamontes tras la inmunolocalización de fosfoepítomos (MPM2), los cuales se relacionaron con proteínas implicadas en cohesión (Suja y col., 1999). La evolución de la señal de SA1 en el centrómero a lo largo de la división meiótica podría venir de la

necesidad de cambio en el refuerzo de la cohesión desde metafase I a metafase II. En metafase I los dos cinetocoros actúan conjuntamente, deben estar cohesionados como una unidad para la orientación sintética y segregación de cromosomas homólogos en anafase I. En metafase II, la cohesión entre cromátidas hermanas debe mantenerse en el centrómero, pero permitiendo que los cinetocoros hermanos actúen independientemente en la interacción con los microtúbulos, favoreciendo una orientación anfitética y una segregación de cromátidas hermanas en anafase II. El cambio en el tipo de señal se distingue exactamente en la etapa de anafase I tardía - telofase I. Se ha descrito que el cambio en la cohesión desde una situación en la que los cinetocoros hermanos están unidos, a otra en la que actúan independientemente se produce en telofase I, etapa donde se distingue la transformación en la señal de proteínas como RAD21 (Parra y col., 2004b; Suja y Barbero, 2009). Por lo tanto, a la vista de nuestros resultados, podemos pensar que SA1 tiene un papel fundamental en la cohesión centromérica en la meiosis de saltamontes, jugando un rol especial en metafase II.

### **1.5. Historia sináptica de los cromosomas.**

La detección secuencial de las cohesinas en profase I tiene un reflejo en la distribución de las cohesinas en metafase I. En esta etapa SMC3 y SMC1 $\alpha$  han sido detectadas en toda la longitud del dominio intercromatídico en todos los tipos cromosómicos analizados en esta memoria. Sin embargo, no hemos detectado RAD21 ni SA1 en el dominio intercromatídico del cromosoma X, ni RAD21 en las regiones distales asinápticas de los bivalentes L1-M8 de *S. grossum*. Actualmente no se ha descrito en ninguna otra especie la ausencia de RAD21 en cromosomas o regiones cromosómicas asinápticas, aunque la ausencia de REC8 se ha descrito en hemípteros del género *Triatoma* en el par sexual asináptico de los machos (Pigozzi y Solari, 2003). En los cromosomas XY de ratón, los cuales sólo forman CS en la región PAR, se ha observado la existencia de un eje de cohesina donde están representadas al menos RAD21, SMC3, STAG3 y SMC1 $\beta$  (Revenkova y col., 2001; Parra y col., 2004b; Page y col., 2006). Sin embargo, la inmunolocalización de REC8 en ratón muestra que esta subunidad de cohesina se acumula en la región PAR, frente a la débil señal que se observa en la región

asináptica de los cromosomas sexuales (Page y col., 2006). En saltamontes, la ausencia de RAD21 y SA1 en metafase I, en regiones donde no se ha completado la sinapsis durante la profase I, descarta una carga posterior a paquitena de dichas cohesinas. Por lo tanto, mediante el análisis de la distribución de determinadas cohesinas en metafase I, podemos inferir la historia sináptica de los cromosomas ocurrida durante la profase I. Así, un cromosoma o región cromosómica donde no detectemos RAD21 o SA1 en su dominio intercromatídico en metafase I, muy probablemente no haya completado la formación del CS durante la profase I.

### **1.6. Posibles funciones adicionales de SA1.**

La cohesión en la región centromérica en meiosis se mantiene hasta metafase II. A partir de esta etapa no habría necesidad de mantener intacto el complejo de cohesina, ya que no hay dos cromátidas hermanas que mantener unidas. Actualmente no se conocen datos sobre la presencia de ninguna cohesina en telofase II. Sin embargo, nosotros hemos detectado que SA1 está presente incluso en los cinetocoros y en los telocoros de todos los cromosomas en anafase II (Fig. 19 de resultados). El hecho de que la separasa actúe sobre la cohesina SCC1/RAD21, hace pensar que quizá el resto de componentes del complejo de cohesina queden intactos, aunque se desestabilice la integridad del complejo de cohesina. Por lo tanto, ya que hemos observado que SA1 está presente en saltamontes hasta telofase II, cabe pensar en la posibilidad de que la subunidad de cohesina SA1, además de en cohesión, esté implicada en otras funciones. Si esto fuera así, cabría pensar que SA1 debería interactuar de alguna manera aún desconocida con el cromosoma o con proteínas centroméricas y/o teloméricas. En la anafase II de ratón se ha observado la presencia, no sólo de SGOL2 (Gómez y col., 2007), sino también de la proteína ADN Topoisomerasa II $\alpha$  (Rocío Gómez, comunicación personal), a la cual también se le reconoce un cierto papel cohesivo. Esta proteína, componente principal del “*scaffold*” cromosómico, en saltamontes queda como una banda entre los cinetocoros hermanos en anafase II temprana y los epítomos fosforilados reconocidos por MPM2 se han detectado en los cinetocoros de cromosomas en anafase II (Dr. José Ángel Suja, comunicación personal). Por lo tanto, la permanencia de SA1 más allá de metafase II y su presencia en los telocoros nos dan pie a especular sobre

funciones adicionales para SA1. Quizá pudiera tener algún papel estructural. Recientemente se ha descrito la presencia de SA1 en los telómeros de células HeLa y se especula con una posible interacción de la cohesina con proteínas teloméricas como TIN1 y TRF1 (Canudas y Smith, 2009). Sin embargo, al igual que el resto de cohesinas analizadas en esta memoria, SA1 no ha sido detectada en mitosis goniales de saltamontes.

## ***2. Dinámica de los complejos de Cohesina.***

En los últimos años, los estudios relativos a la dinámica del complejo de cohesina apuntan hacia la existencia de diferentes complejos de cohesina en un mismo organismo, en la misma célula e incluso en el mismo cromosoma simultáneamente. La idea actual es que distintos complejos de cohesina tendrían funciones específicas diferentes (Revenkova y Jessberger, 2005; Suja y Barbero, 2009). Algunos estudios se basan en la existencia de cohesinas específicas de meiosis o de isoformas diferentes (Prieto y col., 2001; Revenkova y col., 2001). Otros análisis se basan en la diferente localización de las distintas cohesinas (Eijpe y col., 2003; Kitajima y col., 2003) o en su diferente liberación a lo largo de la meiosis (Lee y col., 2003). En saltamontes hemos analizado la distribución de cuatro cohesinas, SMC3, SMC1 $\alpha$ , RAD21 y SA1 y a la vista de nuestros resultados consideramos que probablemente también existan diferentes complejos de cohesina o las diferentes subunidades tengan una dinámica cambiante a lo largo de la meiosis en este tipo de ortópteros.

La detección de RAD21 y SA1 a partir de cigotena en las regiones de sinapsis, frente a la presencia de SMC3 y SMC1 $\alpha$  desde preleptotena (Fig. 24 de resultados), podría estar relacionada, bien con la incorporación de nuevos complejos de cohesina en cigotena o bien con una posible modificación de los complejos preexistentes. Ambas posibilidades explican la distribución observada para dichas proteínas en etapas posteriores de la meiosis de saltamontes. RAD21 y SA1 no se detectan en el dominio intercromatídico de regiones asinápticas en metafase I, lo que podría explicarse si los complejos formados por dichas cohesinas sólo se incorporasen en regiones donde se forma el CS y por tanto se produce la sinapsis entre cromosomas homólogos. Por otro lado, esas cohesinas podrían estar presentes con anterioridad al progreso de la sinapsis,

pero podrían ser modificadas en el momento en que se incorporan los componentes del EC y los FT. Modificaciones que, en el caso de que existieran, las harían detectables bajo nuestras condiciones de trabajo.

Una incorporación diferencial de distintas subunidades de cohesina en meiosis, ha sido sugerida también en mamíferos, donde la proteína REC8, específica de meiosis, se detecta antes que SMC1 $\beta$  y SMC3, infiriendo un posible papel de REC8 en la formación de los EA (Eijpe y col., 2003). En *C. elegans*, se sugiere una incorporación previa de SMC1 y SMC3 independientemente de las cohesinas no SMC (Chan y col., 2003). En mitosis de *S. cerevisiae* se ha descrito que, a pesar de que la cohesión se establece tan sólo en el periodo S, los complejos de cohesina pueden ser incorporados sobre la cromatina a lo largo de todo el ciclo celular (Uhlmann y Nasmyth, 1998; Haering y col., 2004) y se ha postulado una carga postreplicación que contribuiría al correcto funcionamiento de los centrómeros (Ocampo-Hafalla y col., 2007). La incorporación de cohesinas o complejos de cohesina en los lugares donde progresa la sinapsis podría contribuir a la correcta asociación entre cromosomas homólogos. Podemos pensar que la supuesta ronda adicional de subunidades o complejos de cohesina en la meiosis de saltamontes, podría derivar de la posible necesidad de afianzar la cohesión en los bivalentes y contrarrestar así eficazmente las fuerzas de segregación ejercidas en etapas posteriores, en prometáfase I o metafase I y prevenir una separación prematura de los homólogos previa a anafase I.

La información relativa respecto a la interacción de determinadas cohesinas con el progreso de la sinapsis o con componentes del EC y los FT es escasa. En heterópteros se ha descrito la ausencia de REC8 en el par sexual, XY, asináptico de los machos (Pigozzi y Solari, 2003). En *S. cerevisiae* o *C. elegans*, la presencia de REC8 parece ser crítica para la formación del CS (Klein y col., 1999; Pasierbek y col., 2001). En mamíferos se han observado importantes fallos en la sinapsis en mutantes para SMC1 $\beta$  o REC8 (Eijpe y col., 2003; Revenkova y col., 2004) y aunque dichos fallos se han atribuido al posible papel de estas cohesinas en la correcta formación de los EA o en la conformación de la cromatina, se ha sugerido que tanto SMC1 $\beta$  como REC8 serían requeridas para la correcta sinapsis entre cromosomas homólogos. Un ejemplo de esto lo constituyen los ratones “knock-out” para REC8 que presentan más sinapsis entre cromátidas hermanas

que entre cromosomas homólogos y forman EA claramente fragmentado (revisado en (Costa y Cooke, 2007). Con los datos que tenemos, no podemos conocer si existe algún tipo de interacción entre RAD21 y SA1 y la incorporación de las proteínas del EC y los FT o la progresión de la sinapsis en saltamontes, pero la simultaneidad observada entre ambos eventos podría ser indicativo de algún tipo de relación en este tipo de insectos.

Por otro lado cabe destacar la presencia de SA1 en el centrómero de todos los cromosomas en metafase I y su mantenimiento en dicha región hasta telofase II. El resto de cohesinas analizadas no sólo no presentan acumulaciones en las regiones centroméricas, sino que además no son detectadas en metafase II. RAD21 se libera de los brazos cromosómicos en la transición metafase I – anafase I en autosomas y no la volvemos a detectar en etapas posteriores. A las cohesinas SMC, a pesar de que quedan como un punto bajo el centrómero en anafase I y telofase I, no las hemos detectado en la segunda división en saltamontes. Estos datos hacen pensar, no sólo en un posible papel de SA1 específico o de refuerzo en la cohesión centromérica, además de en los brazos cromosómicos en autosomas, sino que evidencian que la liberación de las cohesinas analizadas no sigue un patrón uniforme. De nuevo, esto podría explicarse si en saltamontes existieran complejos de cohesina diferentes, que realizaran funciones diferentes. La implicación de cohesinas específicas en la cohesión centromérica ha sido ampliamente descrita, así por ejemplo en ratón RAD21 podría tener un papel en la cohesión intercinetocórica en metafase I (Parra y col., 2004b). A REC8 se le atribuye un papel especial en la regulación de la cohesión centromérica hasta la segunda división meiótica en ratón, levaduras y *C. elegans* (revisado en (Suja y Barbero, 2009). En general, la presencia de alguna cohesina en los centrómeros en metafase II se ha relacionado con el mantenimiento de la cohesión en dicha región, por lo tanto, cabría pensar que quizá en saltamontes SA1 forme parte de un complejo que tenga especial relevancia en la cohesión centromérica. Además de su implicación en la cohesión braquial hasta metafase I en regiones sinápticas. Igualmente, podemos pensar que el complejo de cohesina en el cual está presente RAD21, al menos la cohesina RAD21 que nosotros detectamos, estaría relacionado exclusivamente con la cohesión braquial en las regiones sinápticas. Por su parte, las dos cohesinas SMC analizadas en esta memoria, podrían formar parte de un mismo complejo, ya que muestran una misma distribución,

localización y liberación a lo largo de toda la meiosis. La presencia de las cohesinas SMC hasta telofase I bajo los cinetocoros hermanos podría revelar una posible implicación en la cohesión intercinetocórica en la primera división meiótica. Por otro lado, la no colocalización completa detectada tras la doble inmunolocalización de las cohesinas SMC y las cohesinas no SMC, podría evidenciar la diferente composición de los complejos de cohesina en saltamontes (Fig. 27 de resultados).

Como siempre que se trabaja con inmunolocalización, podemos pensar que la no detección de determinadas cohesinas puede deberse a que nuestros anticuerpos o la técnica usada no revelan la presencia algunas proteínas en determinadas etapas de la meiosis. La carga de las cohesinas, referida a su incorporación al ADN, ocurre en G1 en levaduras o en la telofase previa en vertebrados y en ambos casos depende del complejo SCC2/SCC4. El establecimiento de la cohesión ocurre en el periodo S, a partir de aquí, el complejo de cohesina canónico, compuesto por cuatro subunidades de cohesina, mantendría la cohesión entre las dos cromátidas hermanas hasta su separación (revisado en (Peters y col., 2008)). Por lo tanto, si asumimos que la cohesión está mediada principalmente por un complejo proteico compuesto por dos subunidades SMC y dos no SMC, al cual se asocian los cofactores de cohesión como PDS5 o Wapl, no debemos pensar que la detección exclusiva de una subunidad de cohesina en alguna etapa de la meiosis, implica que esté realizando la función de cohesión por sí sola. Lo que puede estar ocurriendo es que no somos capaces de detectar todas las subunidades de cohesina existentes, o todas las isoformas posibles o bien que las subunidades de cohesina están modificadas y los anticuerpos utilizados no reaccionan positivamente con ellas. Sin embargo, teniendo siempre en cuenta esta posibilidad, desde nuestro punto de vista, la forma más plausible de explicar todos los resultados relativos a la distribución de las cohesinas en la meiosis de saltamontes es pensar en la existencia de diferentes complejos de cohesina o en que la dinámica de las cohesinas cambia según su localización y/o función.

### ***3. Las Cohesinas y la estructura del cromosoma meiótico.***

Los bucles de cromatina en profase I se organizan, al igual que ocurre en mitosis en cromosomas condensados, a lo largo de un eje proteico, el “scaffold”, anclados

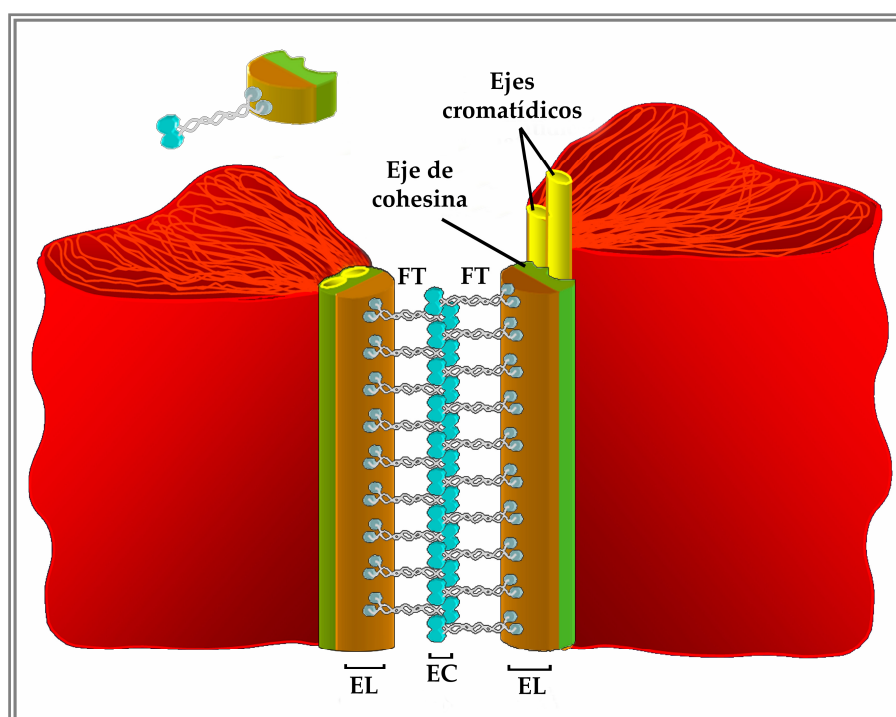
mediante las denominadas regiones SARs (regiones de anclaje al “scaffold”: “*Scaffold Attachment Regions*”) (revisado en (Stack y Anderson, 2001). Aunque el tamaño de los bucles de cromatina varía drásticamente entre especies, ésta organización de bucles radiales está ampliamente extendida entre los diferentes organismos, siendo constante el tamaño medio de los bucles dentro de una misma especie (Moens y Pearlman, 1988; Zickler y Kleckner, 1999). La organización de los cromosomas en espermátocitos de saltamontes ha sido analizada mediante microscopía óptica y tinción argéntica, llegando a la conclusión de que el eje cromatídico teñido con plata corresponde al “scaffold” de cada cromátida hermana (Rufas y col., 1987). Posteriormente se propuso un modelo de organización del cromosoma meiótico donde el “scaffold”, localizado en la base de los bucles de cromatina, actuaría como molde para la organización de los EA/EL (Rufas y col., 1992). Admitiendo este modelo de organización cromosómica, debemos incorporar al mismo la posición relativa de las cohesinas.

### **3.1. El eje de cohesina se arma a nivel del “scaffold”, en la base de los bucles.**

Como hemos mencionado al principio de la discusión, la participación de las cohesinas en la estructura de los EA/EL se ha propuesto en diferentes organismos, sugiriendo que el eje de cohesina se formaría con anterioridad a los EA (Pelttari y col., 2001; Liebe y col., 2004; Page y Hawley, 2004). En mamíferos, mientras los mutantes para proteínas del CS, bien SYCP1, bien elementos como TEX12 o SYCE1, forman ejes de cohesina en profase I, los mutantes para alguna cohesina muestran los EA acortados y fallos en la sinapsis (revisado en (Costa y Cooke, 2007). Estos datos indican que los componentes del CS parecen necesitar de un eje de cohesina correctamente formado para su ensamblaje. Por el contrario, las cohesinas no necesariamente dependen de las proteínas de los EA para la maduración del eje de cohesina. Nuestros resultados muestran que un eje de cohesina lineal, formado al menos por SMC1 $\alpha$  y SMC3, se detecta ya en preleptotena y en leptotena se configura completamente maduro en toda la longitud de los cromosomas en especies con sinapsis completa (Fig. 10 y 11 de resultados). La inmunolocalización de SMC3 y SMC1 $\alpha$  nos ha permitido seguir la sinapsis y hemos inferido que la maduración previa del eje de cohesina podría estar relacionada con la morfogénesis del EA también en saltamontes (Revisar apartado 1.1. y



1.2. de discusión para más información). Antes de estudiarse la localización de las cohesinas en saltamontes, se consideraba que el “*scaffold*” era el armazón sobre el que se anclan los EA (Rufas y col., 1992). Si en saltamontes el eje de cohesina se configura lineal en profase I y se forma con anterioridad a la etapa donde se distinguirían los EA, cabría pensar que en estos Ortópteros el eje de cohesina se ancla al ADN a nivel del “*scaffold*”, por lo tanto en la base de los bucles de cromatina. Sobre ese eje de cohesina cabe pensar que se formarían posteriormente los EA/EL de los cromosomas (Fig. 68). Esta afirmación, se ve reforzada por el hecho de que, en paquitena se observan un número de filamentos de SMC3 y de SMC1 $\alpha$  en la cromatina autosómica, que corresponde con el número de CS que se deberían observar según el complemento cromosómico y las características de las especies estudiadas en la presente memoria. De esta forma, asumimos que en regiones donde hay sinapsis, la presencia del eje de cohesina estaría estrechamente relacionada con la presencia del EA.



**Figura 68: Modelo de organización cromosómica en paquitena.** Esquema adaptado de Rufas y col., 1992. En este modelo, hemos incluido la localización de los ejes de cohesina (piezas verdes), los cuales tendrían una posición periférica respecto a la cromatina (rojo), situados en la base de los bucles, al nivel de los ejes cromatídicos (piezas amarillas). El eje de cohesina sería la base para el ensamblaje de los componentes del CS. EL: elemento lateral (piezas marrones), FT: filamentos transversos (piezas grises). EC: elemento central (piezas azules).

Un caso particular son el cromosoma X y las regiones asinápticas de *S. grossum*, las cuales presentan un eje de cohesina formado al menos por SMC3 y SMC1 $\alpha$ , aunque presentan un cierto retraso en su maduración respecto a las regiones sinápticas. En ese caso, con los resultados que tenemos no podemos relacionar la detección del eje de cohesina con la posible presencia de EA, ya que al no observar sinapsis no sabemos si se incorporan los componentes de los EA. Aunque, si asumimos que las cohesinas SMC y la formación de los EA están íntimamente relacionados, podríamos pensar que en el cromosoma X y en las regiones autosómicas asinápticas de los machos de *S. grossum* se podría formar EA, o al menos tendrían la posibilidad de formarlo, ya que tienen la estructura previa para la incorporación de los elementos necesarios. De hecho, estudios anteriores de microscopía electrónica en Ortópteros si han observado la presencia EA en regiones asinápticas, sugiriendo no sólo que el cromosoma X de machos de *L. migratoria* forma EA, sino también las regiones asinápticas de los machos de *S. grossum* (Moens, 1969; Jones, 1973; Fletcher, 1977).

### **3.2. Las cohesinas y la estructura de los cromosomas en metafase I**

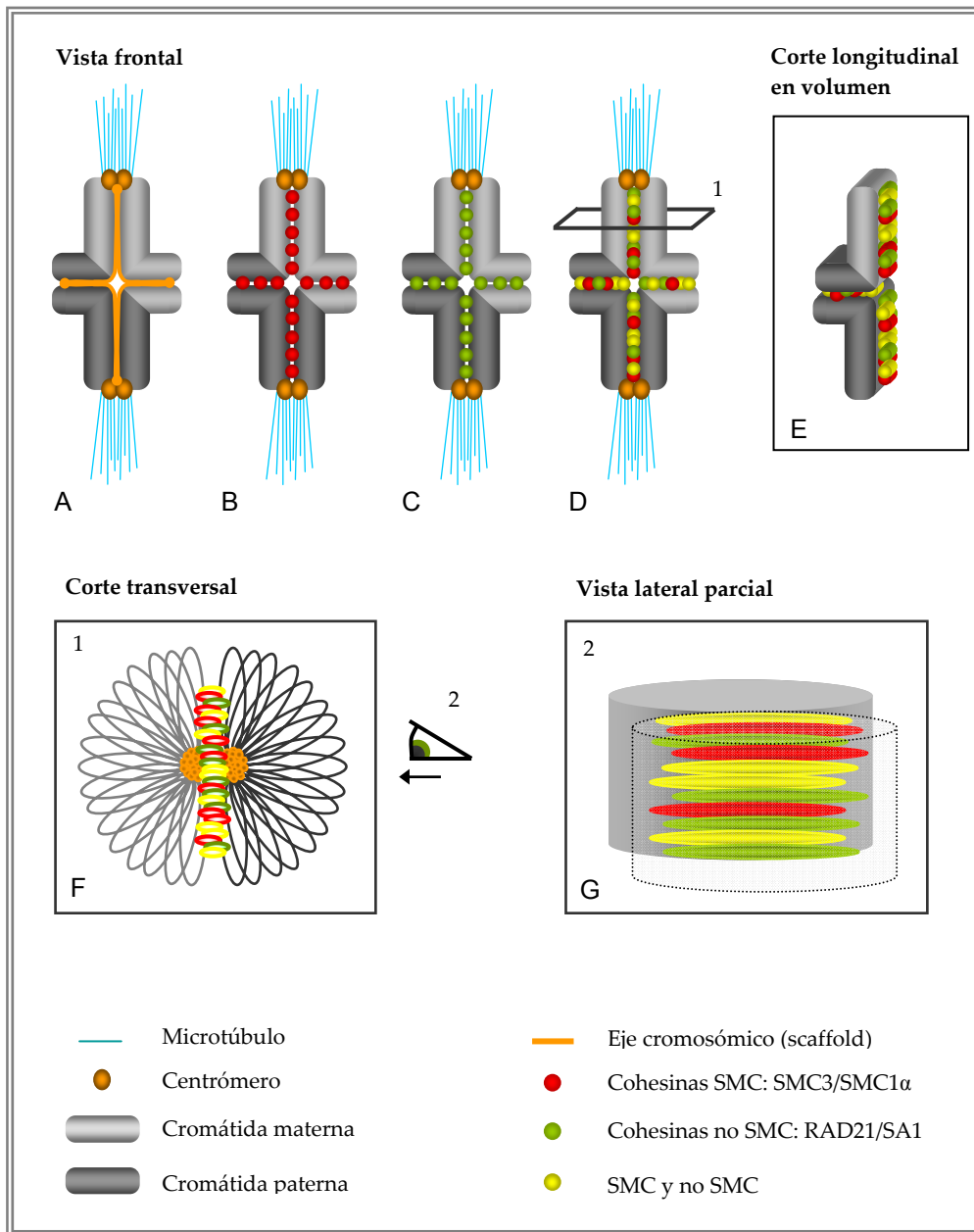
Ya que las diferencias en la detección de las distintas cohesinas en metafase I parece estar directamente relacionada con la historia sináptica de los cromosomas en profase I, los hemos clasificado en tres tipos para analizar su estructura: i) Bivalentes con sinapsis completa; ii) Cromosomas asinápticos: el univalente sexual y un cromosoma B; iii) Bivalentes con sinapsis parcial.

#### **3.2.1. Bivalentes con sinapsis completa.**

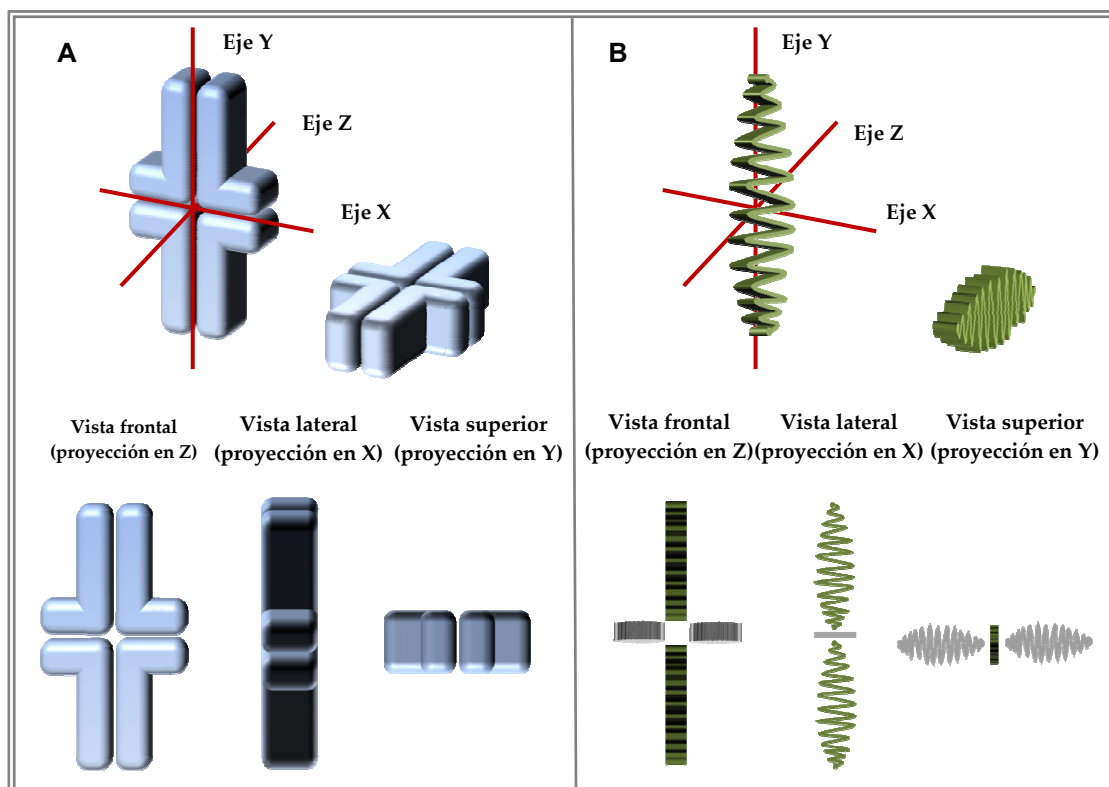
La tinción argéntica revela el “scaffold” cromosómico y nos permite inferir la distribución de los bucles de cromatina en relación al eje donde se anclan (Earnshaw y Laemmli, 1984; Rufas y col., 1987). En metafase I los bivalentes con sinapsis completa presentan los ejes cromatídicos íntimamente asociados en toda su longitud, desde los extremos centroméricos hasta los extremos distales, abriéndose en el punto de quiasma (Fig. 46 de resultados y Fig. 69 A). Esta organización implica que los bucles de cromatina de las cromátidas hermanas deben estar en una posición lateral respecto al eje. Las cohesinas son detectadas como parches continuos en el dominio

intercromatídico, en toda su longitud excepto en el punto de quiasma (Fig. 27 de resultados y Fig. 69 B y C). En vista lateral, esas cohesinas ocupan gran parte del espacio intercromatídico y presentan una organización que recuerda a un zigzag (Fig. 69 E). Esta configuración se detecta con facilidad tanto en células en esparcido (Fig. 12 de resultados) como en reconstrucciones tridimensionales de aplastados (Video 13 y 17 del material suplementario ofrecido en CD). Igualmente lo observaríamos si viéramos una proyección lateral, en el eje X. En aplastados, lo que vemos es una proyección frontal de los bivalentes, una proyección. La proyección en el eje Z de ese zigzag nos da la sensación de linealidad a parches que observamos en metafase I. En la figura 70 hacemos una reconstrucción de las diferentes vistas de un bivalente y de las diferentes proyecciones de una señal en zigzag. Sin embargo, es probable que por influencia del modo de compactación de la cromatina, la señal de las cohesinas sea helicoidal, formada por anillos de cohesina sucesivos. Esa estructura helicoidal o en zigzag estaría ensanchada en la profundidad del cromosoma (eje Z), a lo ancho en vista lateral, ocupando el mayor espacio posible entre las dos cromátidas hermanas. Eso explicaría la vista lateral como zigzag y cuando se proyecta en vista frontal un aspecto lineal de parches contiguos. La doble inmunolocalización de ambos tipos de subunidades de cohesina muestra que no colocan a la perfección, derivado probablemente de la existencia de diferentes complejos de cohesina (Figs. 27, 28 de resultados y 68 D).

Si hiciéramos un corte transversal al bivalente en uno de sus brazos, los ejes cromatídicos estarían en posición central, muy juntos uno al lado del otro. Los bucles de cromatina de cada cromátida hermana se localizarían lateralmente respecto al “*scaffold*”. Las cohesinas se dispondrían entre ambas cromátidas hermanas, ocupando el espacio entre ellas (Fig. 69 F y G). De este modelo podemos deducir que la cohesión en metafase I, en este tipo de cromosomas, no sólo se mantiene en la cromatina a nivel de “*scaffold*” sino también a nivel de bucles.



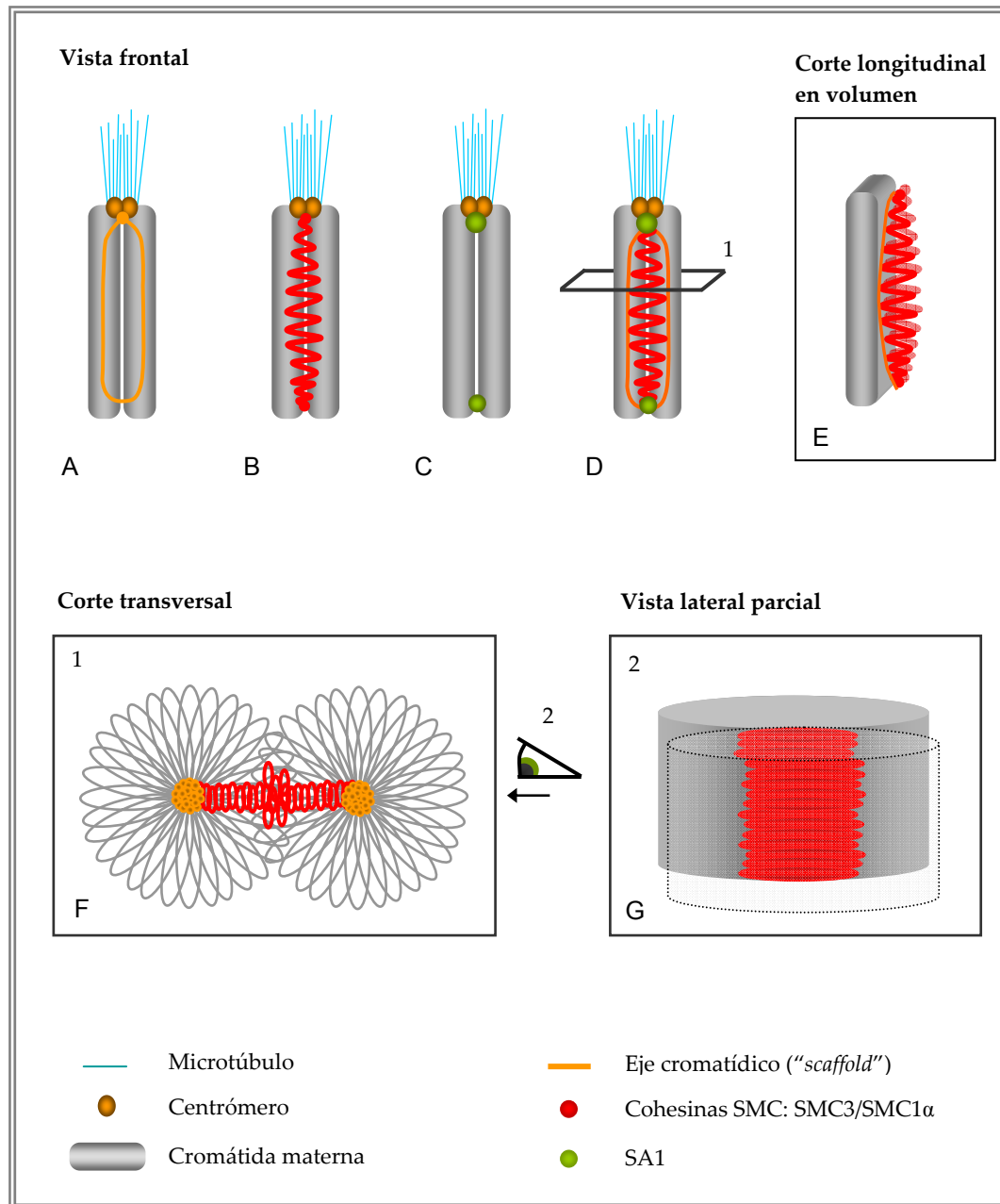
**Fig. 69: Estructura de un bivalente con sinapsis completa y un quiasma intersticial en metafase I.** (A) Posición de los ejes cromatídicos. (B y C) Distribución de las cohesinas. Para simplificar el esquema se ha eliminado la acumulación de SA1 en el centrómero, mostrando sólo la señal en el dominio intercromatídico de las distintas cohesinas. (D) Superposición de los ejes cromatídicos y las cohesinas. (E) Representación de un bivalente en volumen tras un hipotético corte longitudinal en vista frontal y la posición de las cohesinas. (F) Corte transversal (1) en un punto entre el quiasma y el centrómero. (G) Vista lateral del bivalente (2) a la altura del corte transversal de F. Sólo se representa una parte del cromosoma.



**Fig. 70: Vistas de un bivalente con sinapsis completa y la señal en zigzag del dominio intercromatídico.** (A) Arriba a la izquierda se representa una reconstrucción tridimensional de un bivalente con sinapsis completa y un quiasma intersticial sobre el que se han superpuesto los ejes que definen las tres dimensiones. Al lado se esquematiza el bivalente tumbado. Abajo se muestra las vistas frontal, lateral y superior como resultado de la proyección de cada uno de los ejes. (B) Arriba a la izquierda se representa un zigzag que correspondería a la imagen observada con las cohesinas SMC3 y SMC1 $\alpha$  en el bivalente en vista lateral. Para simplificar la reconstrucción tridimensional sólo se representa la visión de las cohesinas desde el punto de quiasma hasta uno de los extremos. Sobre el zigzag se han superpuesto los ejes que definen las tres dimensiones. A la derecha se representa el zigzag tumbado, simulando la posición en el bivalente de A. Abajo en B se representan las proyecciones de la señal en zigzag de las cohesinas SMC en el dominio intercromatídico. En verde se muestra la señal desde el punto de quiasma hacia los telómeros orientados arriba y abajo del bivalente (hacia el eje Y) y en gris desde el punto de quiasma hacia los otros extremos (hacia el eje X). Las vistas frontal, lateral y superior del bivalente y las cohesinas se corresponden.

### 3.2.2. Cromosomas asinápticos: X y B.

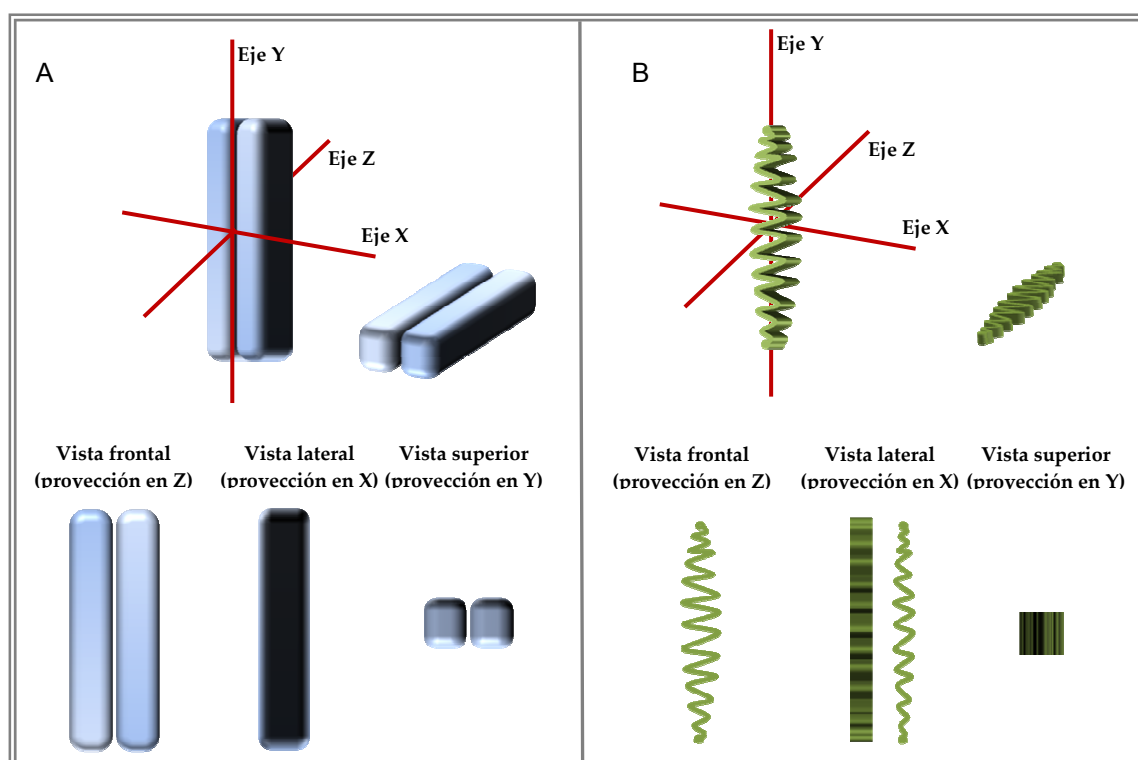
La tinción argéntica en univalentes naturales de saltamontes, muestra que los ejes cromatídicos están separados en toda su longitud excepto en los extremos, donde ambos ejes se unen, dando lugar a una imagen de anillo alargado (Fig. 46 de resultados y 71 A). Estas imágenes sugieren que el “*scaffold*” presenta una posición interna respecto a los bucles de cromatina. La distribución de las cohesinas SMC3 y SMC1 $\alpha$  da lugar a una imagen en zigzag en vista frontal (Fig. 27 de resultados y 71 B y C), es decir en la proyección del eje Z. En la figura 72 se representan las diferentes visiones de un zigzag en los univalentes.



**Figura 71: Estructura de los univalentes naturales en metafase I.** (A) Posición de los ejes cromatídicos. (B y C) Distribución de las cohesinas. (D) Superposición de los ejes cromatídicos y las cohesinas. (E) Representación de un univalente tras un hipotético corte longitudinal en vista frontal y la posición de las cohesinas. (F) Corte transversal (1). (G) Vista lateral del bivalente (2) a la altura del corte transversal de F. Sólo se representa una parte del cromosoma.

De nuevo, esta señal podría ser helicoidal, por influencia de la compactación de la cromatina, ya que en vista lateral se observa esa misma distribución, aunque un poco menos acusada. Por lo tanto, la hélice o el zigzag que pueden estar formando los complejos de cohesina en los cromosomas asinápticos estaría alargado a lo ancho en vista frontal, ocupando el mayor espacio posible entre las dos cromátidas hermanas. Si tenemos en cuenta las imágenes observadas con la tinción con plata, podemos pensar

que ésta organización estaría condicionada por el hecho de que los ejes cromatídicos se presenten abiertos (Fig. 71 D). Si hiciéramos un corte transversal a un univalente en metafase I, de acuerdo con nuestro modelo, deberíamos observar los ejes cromatídicos separados entre sí, en una posición central respecto a la cromatina y entre ellos a las cohesinas SMC uniendo las cromátidas hermanas. Los bucles de cromatina se dispondrían radialmente alrededor del eje donde se anclan, el “scaffold” (Fig. 71 F).



**Figura 72: Vistas de cromosoma asináptico y la señal en zigzag presentada por las cohesinas del dominio intercromatídico.** (A) Arriba a la izquierda se representa una reconstrucción tridimensional sobre la que se han superpuesto los ejes que definen las tres dimensiones. Al lado se esquematiza el univalente tumbado. Abajo se muestran las vistas frontal, lateral y superior como resultado de la proyección de cada uno de los ejes. (B) Arriba a la izquierda se representa un zigzag que correspondería a la imagen observada con las cohesinas SMC3 y SMC1α en vista frontal. A la derecha se representa el zigzag tumbado, simulando la posición en el cromosoma de A. Abajo en B se representan las proyecciones de la señal en zigzag de las cohesinas SMC en el dominio intercromatídico. La señal de vista lateral es un zigzag, pero al ser tan estrecho parece una señal lineal. Las vistas frontal, lateral y superior del cromosoma y las cohesinas se corresponden.

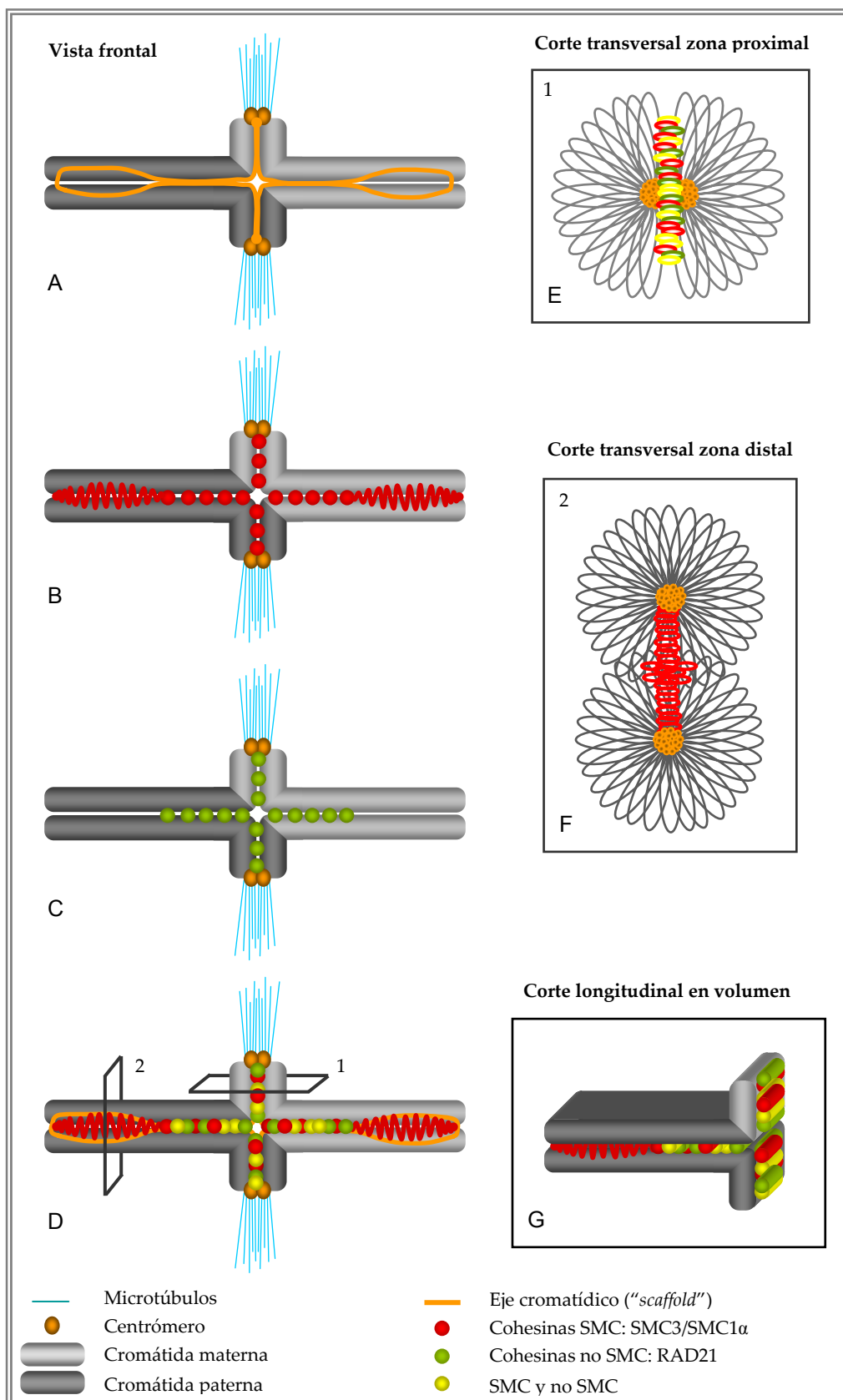
### 3.2.3. Bivalentes con sinapsis incompleta.

Los 8 bivalentes con sinapsis incompleta de *S. grossum* (L1-M8), muestran características de ambos tipos de organización cromosómica. La región proximal alrededor del quiasma, la cual sinapsa durante la profase I, presenta sus ejes cromatídicos muy juntos pero abiertos en el punto de quiasma y la distribución de las

cohesinas SMC y no SMC es aparentemente lineal en vista frontal en el dominio intercromatídico, interrumpiendo su señal en el punto de quiasma. Recuerda por tanto a los bivalentes con sinapsis completa (Fig. 46 de resultados y 73). La región distal, zona asináptica en profase I, muestra sus ejes cromatídicos abiertos pero unidos en el extremo telomérico distal. En esta región no se detectan cohesinas no SMC, pero SMC1 $\alpha$  y SMC3 aparecen en vista frontal en una configuración en zigzag (Fig. 46 de resultados y 73). Esta organización recuerda a la encontrada en el cromosoma X. Todos estos datos sugieren que en los cromosomas L1-M8 de los machos de *S. grossum* coexisten dos tipos de organizaciones cromosómicas, de tal forma que la zona proximal es similar a los bivalentes con sinapsis completa, mientras que la zona distal sería igual al cromosoma X. Lo cual corresponde con la zona sináptica y la zona asináptica respectivamente. Por lo tanto, si hiciéramos un corte transversal de la región proximal observaríamos los ejes cromatídicos muy juntos, los bucles de cromatina organizados lateralmente respecto a ellos y las cohesinas localizadas en todo el espacio existente entre ambas cromátidas hermanas (Fig. 73 E). Si el corte lo hiciéramos hacia un extremo distal, los ejes se distanciarían entre ellos, pudiéndose organizar los bucles de cromatina alrededor de los mismos. En este caso las cohesinas SMC se distribuirían entre los “scaffold” de ambas cromátidas hermanas (Fig. 73 F).

Los datos obtenidos a partir del estudio de la estructura de estos tres tipos cromosómicos, revelan una concordancia entre la estructura cromosómica en metafase I, la distribución y presencia de las cohesinas y la historia sináptica de los cromosomas en saltamontes. Aquellas regiones que muestran asinapsis en paquitena comparten una estructura de ejes cromatídicos abiertos, no detección de cohesinas no SMC y presencia de cohesinas SMC distribuidas ocupando todo el espacio entre ambos ejes. Mientras tanto, las regiones sinápticas presentan sus ejes cromatídicos muy cerca uno del otro, enfrentados, y muestran la existencia de cohesinas SMC y no SMC distribuidas en el ancho del espacio intercromatídico.





**Figura 73: Estructura de los bivalentes L1-M8 de *S. grossum* en metafase I.** (A) Posición de los ejes cromatídicos. (B-C) Distribución de las cohesinas. (D) Superposición de los ejes cromatídicos y las cohesinas. (E) Corte transversal (1) en un punto entre el quiasma y el centrómero. Zona sináptica. (F) Corte transversal (2) en el extremo distal. Zona asináptica. (G) Representación de un bivalente en volumen tras un hipotético corte longitudinal en vista frontal y la posición de las cohesinas.

### **3.3. Recolocación de las cohesinas en diplotena: modelo de trabajo.**

Analizando los datos de la distribución de las cohesinas en paquitena y metafase I, nos damos cuenta que su disposición varía entre ambas etapas de la meiosis. De una posición a nivel de ejes cromatídicos en la base de los bucles de cromatina, pasan a ocupar parte de la superficie de contacto entre las cromátidas hermanas. Es decir de una situación de eje lineal a un zigzag (comparar Fig. 10, 11 y 27 de resultados) Las imágenes parecen indicar que la cohesión en metafase I no sólo se mantiene en la base sino también probablemente a lo largo de los bucles (Fig. 69). Este aparente cambio de localización puede ser debido simplemente a un modelo de organización cromosómica basado en giros helicoidales, quedando las bases de los bucles hacia el interior de la estructura (revisado en (Stack y Anderson, 2001). Sin embargo, consideramos que debe existir una cierta recolocación de las cohesinas, ya que la asociación de los ejes cromatídicos de los bivalentes en metafase I parece ser tan cercana, que la manera más sencilla de explicar las imágenes en zigzag en vista lateral, es asumir que las cohesinas ya no sólo están en la base de los bucles. Asumiendo por tanto una recolocación, ésta debe ocurrir en alguna etapa entre paquitena y metafase I. En este contexto encontramos explicación a las imágenes observadas en diplotena, donde sobre el eje de cohesina comienzan a formarse excrecencias en todo su recorrido, hasta que en diacinesis observamos que las cohesinas se localizan en el dominio intercromatídico de los cromosomas (Fig. 12 y 13 de resultados). En base a estos resultados hemos generado modelo de la posible recolocación de las cohesinas (Fig. 74). Para facilitar la comprensión del modelo propuesto hemos escogido como base la distribución de las cohesinas en un bivalente con sinapsis completa, ya que es la situación más generalizada. A partir de hipotéticos cortes transversales desde leptotena hasta diplotena tardía intentaremos explicar la posición del eje de cohesina, los ejes cromatídicos, los EA/EL, el EC y los FT en cada una de las etapas.

En etapas de leptotena cada cromátidas hermana (bucles azules y grises) ocuparía una posición lateral respecto a su eje cromatídico (Rufas y col., 1992). Las cohesinas en esta etapa se visualizan como un eje lineal (Fig. 10 y 11 de resultados), el eje de cohesina (líneas verdes), el cual se formaría en la base de los bucles de cromatina entre ambas cromátidas hermanas. Sobre esa organización se ensamblarían los

componentes de los EA (líneas rosas). De esta forma, el EA interaccionaría con el eje de cohesina, “atrapándolo” en esa posición. En un corte transversal (Fig. 74 B sección 1), podríamos pensar que cada cromátida hermana está en una posición lateral respecto a su eje cromatídico, pero que en el conjunto de ambas la cromatina rodea a los dos “scaffold” de cromátidas hermanas. En cigotena los EA de los cromosomas homólogos, asociados al eje de cohesina, deben enfrentarse para que puedan ensamblarse el EC y los FT entre ellos. Por lo tanto, si el eje de cohesina sigue asociado a los EA, debe permanecer en la base de los bucles de cromatina, a nivel de ejes cromatídicos e interaccionando con los EA/EL de los cromosomas. Si hiciéramos una sección transversal de dos cromosomas homólogos alineados en cigotena (Fig. 74 B sección 2), lo que esperaríamos es que los EA estuvieran enfrentados, al igual que los ejes de cohesina, y las parejas de ejes cromatídicos estuvieran íntimamente asociadas, como se deduce de estudios previos (Rufas y col., 1992). Esto explicaría las imágenes observadas en cigotena de asociación por parejas de ejes de cohesina lineales conformados al menos por SMC3 y SMC1 $\alpha$  (Fig. 10 y 11 de resultados). Según progresa la sinapsis se ensamblarían el EC y los FT sobre los EA.. Por lo tanto, si esto es así, en paquitena (Fig. 74 B sección 3) las cohesinas mantendrían unidas a las cromátidas hermanas en la base de los bucles, podríamos decir también que la cohesión se mantiene en la cromatina al nivel del “scaffold”. En cigotena y paquitena, los cromosomas homólogos se organizarían alrededor de un eje central formado por los componentes del CS, los ejes de cohesina y los ejes cromatídicos. La cromatina de las cuatro cromátidas debería repartirse alrededor de ese eje. Lo más fácil sería pensar que cada cromátida ocuparía un cuarto del espacio existente alrededor de ese eje central, aunque la plasticidad de la cromatina haría probablemente que bucles de cromátidas hermanas u homólogas se mezclen. Una vez ha finalizado la paquitena y entramos en diplotena, se ha descrito que en saltamontes los EL del CS, revelados sobre esparcidos de espermatoцитos teñidos con plata, no se separan como una cremallera ni forman burbujas, sino que el CS en su totalidad se fragmenta (Rufas y col., 1992). Estos datos indicarían que los elementos del CS podrían desaparecer por completo después de paquitena en saltamontes. En mamíferos sí se observan horquillas o burbujas de desinapsis compuestas por proteínas de los EL y cohesinas (Prieto y col., 2001; Revenkova y col., 2001; Parra y col., 2004b; Hamer y col.,

2006; de la Fuente y col., 2007). Sin embargo, en saltamontes es justo en diplotena cuando comenzamos a observar las excrecencias en el eje de cohesina mencionadas anteriormente (Fig. 12 y 13 de resultados). Teniendo en cuenta la idea de recolocación de las cohesinas presentada en este modelo, consideramos que esas excrecencias podrían corresponder a los lugares donde se ha fragmentado el CS, quedando por tanto las cohesinas “libres”, antes asociadas a los componentes del EL. Es en este punto cuando las cohesinas comenzarían a recolocarse de una posición lateral respecto a los bucles de cromatina, a una posición ya no sólo en la base de los bucles, sino en el dominio intercromatídico de cromátidas hermanas a nivel de la extensión del bucle, de ahí derivarían las imágenes de excrecencias salientes del eje central de cohesinas en diplotena (Fig. 74 B sección 4). En diplotena temprana, los ejes de cohesina podrían seguir enfrentados y el hipotético espacio ocupado por cada cromátida hermana alrededor de su eje cromatídico, sería de un cuarto. Sin embargo, si avanzamos más en esta etapa meiótica, podemos distinguir que los ejes de cohesina en los extremos de los bivalentes se abren (Fig. 13 A de resultados), pero seguimos observando éstas excrecencias. Siguiendo con nuestro modelo, podemos pensar que ese tipo de imágenes refleja no sólo una recolocación de las cohesinas, sino que además puede que los bucles de cromatina, sin dejar de estar en posición lateral respecto a su eje cromatídico, se estén reorganizando para ocupar un mayor espacio alrededor de dicho eje (Fig. 74 B sección 5). Según se van separando los homólogos, los bucles de cromatina se desplazan dejando un eje central constituido por los ejes cromatídicos hermanos y parte de las cohesinas. Esto es precisamente lo que se deduce de la estructura observada en los bivalentes en metafase I y pensamos que los cambios en la organización cromosómica observados en diplotena, se dirigirían hacia alcanzar esa estructura cromosómica. Por tanto, según avanza la meiosis los bucles de cromatina se desplazarían alrededor de su eje y las cohesinas pasarían a ocupar el espacio entre ellos, dando lugar a un mantenimiento de la cohesión en la cromatina no sólo al nivel del “*scaffold*”, sino también en los bucles (Fig. 74 B sección 5). Por supuesto, todo este proceso está acompañado por una compactación progresiva de la cromatina. Tampoco debemos considerar ni al eje de cohesina ni al “*scaffold*” como ejes rígidos, es probable que la dinámica de ambas estructuras sea mucho más plástica.

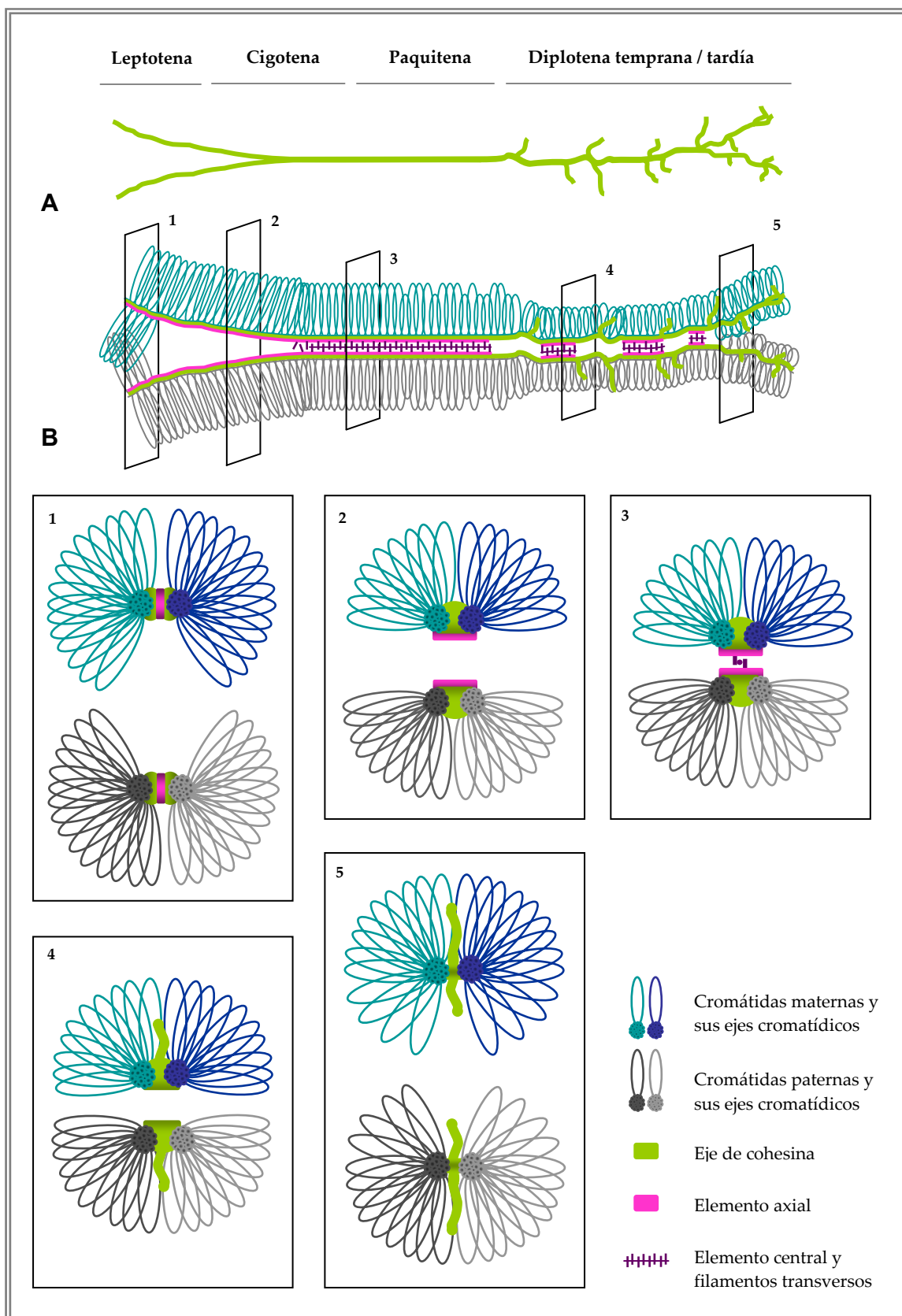


Figura 74: Organización del eje de cohesinas, el "scaffold", la cromatina y el CS en la profase I de saltamontes.

Resumiendo, desde paquitena hasta metafase I, las cohesinas se recolocan, desde una organización estrictamente lineal (eje de cohesina) cuando los cromosomas están unidos por el CS, hasta una disposición que abarca gran parte del espacio existente entre las dos cromátidas hermanas, las cuales se organizan de forma lateral en relación a un eje común, formado por los dos ejes cromatídicos íntimamente unidos. Esa expansión de las cohesinas, para abarcar el dominio intercromatídico podría dar lugar a las excrecencias que observamos en diplotena. Un punto de conflicto en todo este proceso es el lugar donde se producen los quiasmas. Pero en esos puntos no se distinguen cohesinas ni en diacinesis ni en metafase I, lo que indicaría que probablemente los complejos de cohesina se disocian o se liberan en dichos puntos, para facilitar el intercambio de material genético entre cromátidas homólogas.

#### **4. Univalentes naturales en *E. plorans*.**

Los dos univalentes naturales son los únicos cromosomas del complemento de *E. plorans* que presentan los ejes cromatídicos separados, unidos tan sólo en los extremos (Fig. 36 de resultados y Fig. 71). Además comparten la misma distribución de las cohesinas, diferenciándose de los autosomas en que SA1 no se detecta en el dominio intercromatídico, aunque sí se acumula en el centrómero en metafase I. Lo mismo ocurre con MPM2 (Fig. 37 de resultados). El anticuerpo MPM2 reconoce una batería de proteínas fosforiladas entre las que se encuentra la ADN Topoisomerasa II $\alpha$ , constituyente principal del “scaffold” (Earnshaw y col., 1985). Se ha sugerido que esas proteínas fosforiladas pudieran tener un papel en la cohesión de cromátidas hermanas en autosomas en la meiosis de saltamontes (Suja y col., 1999). Al observar que en los univalentes naturales MPM2 y SA1 tan sólo marcan el centrómero, podríamos deducir que dichas proteínas no mediarían la cohesión braquial, aunque sí podrían tener un papel en la cohesión centromérica. Las cohesinas SMC sin embargo, sí son detectadas en el dominio intercromatídico desde profase I hasta metafase I y quedan como un punto bajo el centrómero hasta telofase I, igual que en los autosomas. Estos datos indican que los univalentes naturales sí forman un eje de cohesina durante la profase I. Aunque, a la vista de nuestros resultados, en ese eje de cohesina no participaría SA1. La no detección de SA1 en el dominio intercromatídico de los univalentes, corrobora lo observado en los

bivalentes: la incorporación de SA1 en saltamontes está estrechamente relacionada con el progreso de la sinapsis.

En los univalentes naturales no sólo hemos observado coincidencias en la distribución de las cohesinas, también hemos analizado proteínas relacionadas con el inicio de la recombinación y hemos encontrado que ambos univalentes presentan similitudes en su marcaje. La fosforilación de la histona H2AX en la serina 139, se ha descrito como una de las primeras respuestas al daño en el ADN y especialmente como consecuencia de las “DSB” meióticas (Lowndes y Toh, 2005). Pero, esta modificación histónica se ha relacionado también con el silenciamiento génico de los cromosomas sexuales en ratón, y parece ser esencial para su condensación (Fernández-Capetillo y col., 2003). En este caso, la fosforilación de H2AX para dar lugar a  $\gamma$ -H2AX en el XY de ratón parece ser independiente de SPO11, apareciendo el par sexual marcado de forma exclusiva en paquitena y diplotena temprana y observándose además en las espermatidas (Mahadevaiah y col., 2001; Bellani y col., 2005). Actualmente se conoce que la kinasa ATR, a la que se le atribuye la fosforilación de H2AX, para dar lugar a  $\gamma$ -H2AX en los autosomas, es dispensable para la formación de  $\gamma$ -H2AX en el cuerpo sexual (Bellani y col., 2005). Todos estos datos sugieren que la fosforilación de H2AX en los cromosomas sexuales no sigue la misma vía que la derivada como marcaje de daño genético. El fenómeno de inactivación meiótica de los cromosomas sexuales (“*MSCI: Meiotic Sex-Chromosome Inactivation*”) también se ha descrito en saltamontes, concretamente en los machos de *E. plorans*, donde “*MSCI*” parece ocurrir antes que el inicio de la recombinación y de forma independiente a la sinapsis, de hecho podría conservarse en todo el ciclo celular (Cabrero y col., 2007). Nuestros datos, muestran que el cromosoma X de *L. migratoria* y de *E. plorans* y el cromosoma B de esta última especie permanecen extensamente marcados con  $\gamma$ -H2AX en cigotena y paquitena, incluso cuando la sinapsis ha finalizado por completo en los autosomas (Fig. 39 de resultados). Es importante destacar que en paquitena, al contrario de lo que ocurre en ratón (Mahadevaiah y col., 2001), el marcaje de  $\gamma$ -H2AX sobre el cromosoma X y el B define un cordón dentro de su cromatina. Quizá esto sea debido a diferencias en la compactación y organización de la cromatina sexual entre mamíferos y saltamontes. Si el marcaje de  $\gamma$ -H2AX en los univalentes se debiera a “DSB” esperaríamos ver focos de

proteínas de reparación en su cromatina. La ausencia de RAD51 en la cromatina del X y sobre el eje de cohesina de B parece indicar que el marcaje de  $\gamma$ -H2AX en los univalentes no se debe a señalización de daño genético (Fig. 40 de resultados). Por lo tanto, podríamos pensar que el silenciamiento génico del X y del B en saltamontes también implica a  $\gamma$ -H2AX. Datos contrarios han sido observados en machos de rata y ratón, donde se han detectado numerosos focos de RAD51 en paquitena temprana en el eje asinapsado del cromosoma X (Ashley y col., 1995; Barlow y col., 1997; Moens y col., 1997; Mahadevaiah y col., 2001), así como en el cromosoma Z de oocitos de pollo (Ashley y col., 1995). Por otra parte, en humanos se ha observado que tanto el cromosoma X como el cromosoma Y de los hombres presentan intenso marcaje de RAD51 en sus EA, exceptuando el bloque heterocromático del cromosoma Y (Barlow y col., 1997).

En cualquier caso, hemos detectado que el X y el B en saltamontes siguen un patrón de condensación de la cromatina similar, heteropicnótico positivo con DAPI, comparten la misma estructura, la misma distribución de cohesinas y muestran el mismo marcaje con MPM2 y  $\gamma$ -H2AX. Todos estos resultados y los datos obtenidos por otros autores a partir de estudios del ADN satélite centromérico (López-León y col., 1994; Cabrero y col., 1999; Cabrero y col., 2003) sugieren un comportamiento similar de ambos univalentes en meiosis (Viera y col., 2004).

## **5. Relación temporal entre la Recombinación y la Sinapsis.**

Los machos de las tres especies analizadas tienen un complemento cromosómico de 22 autosomas y un único cromosoma X, el cual actúa como univalente natural. En *L. migratoria* y *E. plorans* no se han descrito fenómenos de restricción que afecten a la recombinación o a la sinapsis. Sin embargo, en *S. grossum* encontramos que 8 de los 11 bivalentes que se forman en meiosis presentan sinapsis parcial, localizada en la región proximal y además restricción en la localización y número de quiasmas. Por lo tanto, hemos considerado necesario dividir los apartados de discusión en función de éstas diferencias entre especies. Así, en este punto número 5 de la discusión incluiremos los datos relativos a los resultados de *L. migratoria* y *E. plorans*, pero debemos destacar que



la relación temporal existente entre la sinapsis y la recombinación es común a las tres especies.

### **5.1. El inicio de la recombinación es anterior a la sinapsis.**

Desde el momento en que identificamos que las primeras señales de  $\gamma$ -H2AX en saltamontes se producen en la etapa de leptotena, podemos inferir que los fenómenos de inicio de la recombinación son previos al comienzo de la sinapsis (Fig. 29 de resultados). La señal de  $\gamma$ -H2AX en las primeras etapas de la meiosis se identifica con los lugares de “DSB” (Rogakou y col., 1998; Paull y col., 2000; Hunter y Kleckner, 2001). Anticuerpos específicos contra esta variante histónica han sido ampliamente utilizados para identificar el inicio de la recombinación meiótica (Paull y col., 2000; Mahadevaiah y col., 2001; Fernández-Capetillo y col., 2003; Fernández-Capetillo y col., 2004; Kuo y Yang, 2008). La identificación de la sinapsis en saltamontes se ha llevado a cabo mediante la inmunolocalización de SMC3 o SMC1 $\alpha$ , basándonos en que definen una señal en profase I similar a los EA/EL de los cromosomas. Con los datos que tenemos actualmente no podemos asegurar cual es la relación de dependencia entre las “DSB” y la sinapsis en saltamontes, pero estas evidencias apuntan a que, la relación temporal entre la sinapsis y la recombinación es similar a la observada en ratón, humanos, levaduras y *A. thaliana* (Ashley y col., 1995; Kleckner, 1996; Keeney y col., 1997; Mahadevaiah y col., 2001; Gerton y Hawley, 2005). Por el contrario, en *D. melanogaster* y *C. elegans* los procesos de inicio de la recombinación se retrasan hasta haberse completado la formación del CS (Dernburg y col., 1998; McKim y Hayashi-Hagihara, 1998). Aunque no tenemos datos de la naturaleza de la enzima responsable de las “DSB” en saltamontes, lo más factible sería la participación de alguna enzima similar u homóloga de SPO11, ya que esta proteína se encuentra en la mayoría de los organismos estudiados hasta la fecha.

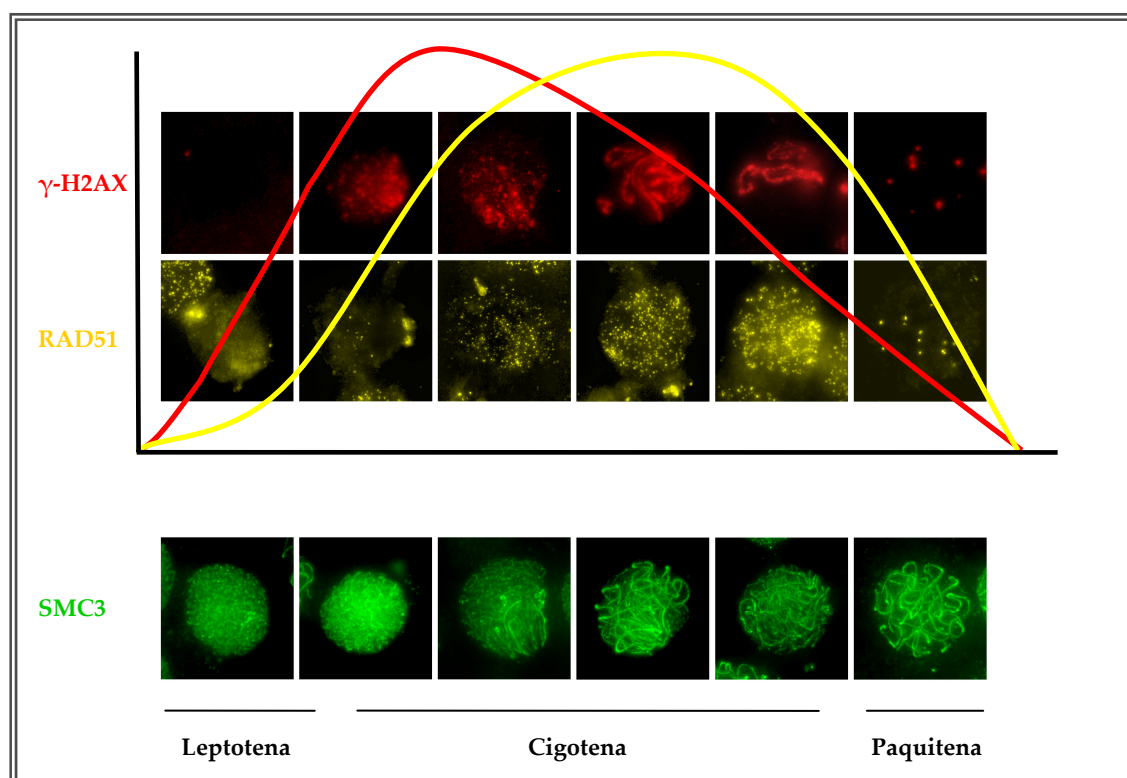
En ratón, la desaparición de la señal de  $\gamma$ -H2AX en los autosomas se correlaciona con la aparición del CS y se postula que el progreso de la sinapsis puede estar influenciado por la reparación de las “DSB” (Mahadevaiah y col., 2001). En saltamontes la distribución y dinámica de la señal de  $\gamma$ -H2AX en meiosis y su relación con el progreso de la sinapsis, coinciden con el modelo observado en ratón. Los primeros focos de  $\gamma$ -H2AX aparecen en leptotena, etapa donde no ha comenzado la

formación del CS y donde se observan ejes de cohesina finos y no asociados por parejas. Según avanza el proceso sináptico, en cigotena se observa una disminución de la señal de  $\gamma$ -H2AX, quedando como cordones en las regiones donde no se ha completado la sinapsis. En paquitenia temprana se observan focos discretos de la histona sobre algunas regiones sinapsadas. En paquitenia tardía no se detecta marcaje de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 29 y 30 de resultados). Tras la formación de las “DSB” meióticas y su señalización con  $\gamma$ -H2AX, las recombinasas RAD51 y DMC1 se incorporan en los puntos de rotura (Roeder, 1997). Estas proteínas son consideradas como marcadores de las interacciones ADN-ADN tempranas (Moens y col., 2002). En rata y ratón forman parte de los nódulos de recombinación tempranos en meiosis (Masson y West, 2001), aparecen en leptotena, aumenta su señal en cigotena y quedan como focos discretos en paquitenia, siempre asociados a los EA/EL de los cromosomas (Barlow y col., 1997; Tarsounas y col., 1999; Mahadevaiah y col., 2001). Nuestros resultados muestran una situación similar. La presencia de focos de RAD51 se detecta por primera vez en leptotena tardía, asociados a los ejes de cohesina. En cigotena media hay un gran incremento en la señal de RAD51 y los focos se localizan sobre los ejes de cohesina tanto en regiones donde se observa la asociación por parejas de los mismos, como en regiones donde todavía se detectan sin asociar, según si han completado la sinapsis o no. Por último, en paquitenia los pocos focos de RAD51 que quedan se detectan sobre los ejes de cohesina de los cromosomas sinapsados (Fig. 31 de resultados). Estas observaciones, junto con el hecho de que la presencia de RAD51 se detecta ligeramente más tarde a la aparición de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 75), coinciden con el proceso de recombinación descrito para levaduras, ratón, humanos y *A. thaliana* (Kleckner, 1996; Roeder, 1997; Grelon y col., 2001; Mahadevaiah y col., 2001), donde RAD51 es una de las primeras proteínas de la cascada metabólica activada tras las roturas de doble cadena (Roeder, 1997; Fernández-Capetillo y col., 2003) y está implicada directamente en la búsqueda de homología entre cromosomas (Shinohara y Shinohara, 2004).

## **5.2. La señal de $\gamma$ -H2AX en los autosomas en paquitenia.**

A pesar de que el inicio de la recombinación comienza antes que la sinapsis en ratón, levaduras, plantas y humanos (Kleckner, 1996; Roeder, 1997; Grelon y col., 2001;

Mahadevaiah y col., 2001; Gerton y Hawley, 2005), la formación de los quiasmas parece ocurrir en el entorno de un CS ya formado (Heyting, 2005; Kleckner, 2006). Así por ejemplo en ratón se conoce que la formación del CS, concretamente la incorporación de los FT, es necesaria para que algunos de los puntos de inicio de la recombinación den lugar a SBC (de Vries y col., 2005) y se ha observado además que ratones deficientes en TEX12, componente del EC del CS, carecen de quiasmas (Hamer y col., 2008). Por otro lado, aunque la dinámica de desaparición de  $\gamma$ -H2AX no está convenientemente definida, la presencia de  $\gamma$ -H2AX en paquitena se ha relacionado en algunos casos con los puntos de SBC en mamíferos (Rowland y col., 2009).



**Figura 75: Dinámica de  $\gamma$ -H2AX (rojo) y RAD51 (amarillo) desde leptotena hasta paquitena en saltamontes.** En verde se observa el seguimiento de las etapas de la meiosis mediante el marcaje de SMC3. La línea roja corresponde al ciclo de aparición y desaparición del marcaje de  $\gamma$ -H2AX, observándose el pico máximo en etapas de cigotena temprana. La línea amarilla marca el ciclo de aparición y desaparición de RAD51 marcando un pico máximo alrededor de las etapas de cigotena media.

En saltamontes, hemos observado que en paquitena temprana la señal de  $\gamma$ -H2AX queda restringida en los autosomas a puntos discretos localizados sobre el eje de cohesina (Fig. 29 de resultados). Estos focos van desapareciendo según avanza la meiosis y hemos contabilizado que la media de señales de  $\gamma$ -H2AX en espermatoцитos de

*L. migratoria* en etapas de paquitena temprana, coincide con la frecuencia de quiasma de la especie, entre 12 y 18 (Quevedo y col., 1997). Aunque en saltamontes no tenemos evidencias directas de que la resolución de los puntos de SBC se produzca en paquitena, el modelo de secuencia temporal descrito entre los procesos de recombinación y sinapsis y la presencia de focos de  $\gamma$ -H2AX en paquitena, sugieren que la formación de quiasmas en saltamontes podría ocurrir también en el entorno de un CS ya formado.

### **5.3. La señal de $\gamma$ -H2AX en las espermátidas.**

La formación de las espermátidas requiere una compactación especial de la cromatina, en este proceso podrían estar implicadas roturas transitorias en el ADN. Como consecuencia de dichas roturas se observa un intenso marcaje en las espermátidas tras la inmunolocalización de  $\gamma$ -H2AX en ratón (Mahadevaiah y col., 2001; Leduc y col., 2008). Esta señal por tanto, sería independiente de las “DSB” meióticas (Hamer y col., 2003). El hecho de que en saltamontes las espermátidas exhiban de igual forma marcaje de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 30 de resultados), hace pensar que como en ratón, esta señal podría deberse a procesos de roturas derivados de la necesidad de compactación de la cromatina y no a “DSB” de recombinación.

## **6. La Recombinación recíproca en *S. grossum*.**

La característica distintiva de los machos de *S. grossum* es que 8 de sus 11 bivalentes presentan sinapsis parcial, restringida a la región proximal y el número de quiasmas se reduce a uno por bivalente, excepto en el M9 donde ocasionalmente se observan dos. El quiasma único que se observa en los 8 bivalentes largos se localiza siempre en una posición proximal (Jones, 1971). En cuanto a la relación temporal entre el inicio de la recombinación y la sinapsis no haremos mayor hincapié ya que es igual a la de especies con sinapsis completa como *L. migratoria* y *E. plorans*. Por lo tanto, tal y como acabamos de discutir, las “DSB” de inicio de recombinación preceden al comienzo de la formación del CS. Lo que hace que el modelo de *S. grossum* sea tan relevante como para discutirlo independientemente es que hemos observado que los focos de  $\gamma$ -H2AX y RAD51 se polarizan en un determinado dominio nuclear, coincidiendo con las

regiones cromosómicas que presentan adelantada la maduración del eje de cohesina, hecho que hemos relacionado con la morfogénesis del EA.

### **6.1. Relación entre la maduración del eje de cohesina y las “DSB”.**

Los focos de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 se polarizan en una región nuclear desde que se detectan en las primeras etapas de la meiosis, localizándose sólo en los ejes de cohesina que exhiben un estado avanzado en su maduración (Fig. 48 y 49 de resultados). Posteriormente, esas regiones que han sufrido las “DSB” son aquellas regiones cromosómicas que presentarán sinapsis en paquitena. Los únicos cromosomas que tienen sinapsis completa son el M9, S10 y S11, el resto de los bivalentes de su complemento (L1-M8) presentan sinapsis incompleta restringida región cercana al centrómero (Wallace y Jones, 1978) Por lo tanto, podemos pensar que en leptotena, los cromosomas cortos M9, S10 y S11 y las regiones proximales del resto de bivalentes son las que, polarizadas en un dominio nuclear, presentan el eje de cohesina maduro y las únicas donde detectamos las proteínas de inicio de la recombinación. Por el contrario, aquellas regiones cromosómicas retrasadas en la maduración del eje de cohesina, el cromosoma X y las regiones distales de los bivalentes L1-M8, permanecen exentas de “DSB” y de señales de RAD51 y no completan la sinapsis. Observaciones similares han sido descritas en otro ortóptero, *P. meridionalis*, en donde los extremos cromosómicos no centroméricos, que presentan una maduración adelantada del eje de cohesina, son las únicas capaces de reclutar la maquinaria de recombinación y de presentar sinapsis (Viera y col., 2009b). La polarización de la señal de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 no se observa en las otras dos especies estudiadas en esta memoria, *L. migratoria* y *E. plorans*. Ambas presentan un marcaje de  $\gamma$ -H2AX en todo el núcleo y posteriormente sinapsis completa en todos sus bivalentes autosómicos (Fig. 29 de resultados). Como ya hemos mencionado anteriormente, desde que en mamíferos existen evidencias directas de la relación entre la formación del eje de cohesina y el ensamblaje de los componentes de los EA (Revenkova y col., 2004), nuestras observaciones de la maduración del eje de SMC3 y SMC1 $\alpha$  podrían ser interpretadas como un reflejo de la morfogénesis de los EA de los cromosomas. Por lo tanto, podríamos pensar que la señal de  $\gamma$ -H2AX y de RAD51 se polariza sobre las regiones cromosómicas que presentan un EA maduro en

leptotena. La implicación de las cohesinas en la recombinación meiótica parece fundamental desde el momento en que permiten que, a pesar del daño en el ADN, las cromátidas hermanas se mantengan fuertemente unidas (revisado en (Peters y col., 2008). A su vez, RAD51 y DMC1 se localizan en meiosis sobre los EA en mamíferos (Tarsounas y col., 1999) y sobre el eje de cohesina en saltamontes. En conjunto, estos datos indican que la maduración del eje de cohesina, o los EA de los cromosomas, podría estar influenciando en la polarización de las “DSB” y RAD51, o viceversa, en los machos de *S. grossum* (Calvente y col., 2005).

## **6.2. La importancia de la cromatina.**

Además de los datos relativos a una maduración diferencial del eje de cohesina, hemos observado en los espermatoцитos en profase I de *S. grossum* que algunas modificaciones histónicas también se encuentran polarizadas. En esta memoria hemos presentado datos de la H3K9me3, pero también hemos analizado la H3K27me3 con idéntico resultado en la cromatina autosómica. Los resultados muestran que el dominio nuclear donde detectamos H3K9me3 es el mismo en el cual identificamos las “DSB” mediante el marcaje de  $\gamma$ -H2AX (Fig. 53 de resultados). La trimetilación de la lisina 9 en H3 está relacionada con heterocromatina constitutiva y silenciamiento génico en mamíferos. En células humanas se ha observado una asociación de H3K9me3 con la heterocromatina centromérica (Zinner y col., 2006). La relación de las modificaciones de H3 en su lisina 9 con el silenciamiento génico y la heterocromatina se explica por su relación con la proteína HP1. Esta proteína y todas sus variantes son proteínas no histónicas asociadas a la cromatina y relacionadas con el modelo de compactación y organización de la heterocromatina (Eissenberg y Elgin, 2000). Este tipo de modificación, así como las acetilaciones o ubiquitinaciones, influyen directamente en la dinámica estructural del nucleosoma, y por lo tanto contribuyen en el grado de accesibilidad de la cromatina (Sims y col., 2003). Este hecho podría influir en la incorporación de determinados factores o complejos proteicos, como puede ser el complejo de cohesina o los factores implicados en la recombinación meiótica. La formación de las “DSB” está estrechamente asociada a la estructura de la cromatina y tienden a ocurrir en “regiones abiertas” de cromatina o regiones hipersensibles a

nucleasas (Fan y Petes, 1996), asociadas a los llamados “puntos calientes” de la recombinación (Ohta y col., 1994; de Massy, 2003). El estado de la cromatina puede por tanto influir en la recombinación. Así por ejemplo, la ubiquitinación de la histona H2B es necesaria para la incorporación o estabilización de la maquinaria que forma las “DSB” en levaduras (Yamashita y col., 2004). La proteína HIM-17, necesaria para la correcta acumulación de metilaciones en la lisina 9 de la histona H3 en profase I, es esencial para la formación de “DSB” meióticas, aunque dispensable para la sinapsis en *C. elegans* (Reddy y Villeneuve, 2004; Gerton y Hawley, 2005). Estudios en células HeLa muestran que la interacción con el ADN del factor SNF2h, implicado en la remodelación de la cromatina, puede estar influenciada por el estado de metilación de la cromatina. Por otro lado, se ha sugerido que SNF2h y el complejo del que forma parte interactúan directamente con determinadas secuencias de ADN, haciendo accesible la cromatina para la incorporación del complejo de cohesina (Hakimi y col., 2002). Más allá del hecho de que la modificación H3K9me3, la maduración anticipada del eje de cohesina y la formación de “DSB” coinciden en el tiempo y en el espacio, actualmente no tenemos datos de si en los machos de *S. grossum* la metilación de H3 puede influir en una maduración diferencial del eje de cohesina y en la restricción de los fenómenos de recombinación. Sin embargo, todos los resultados y los antecedentes citados sugieren que quizá la cromatina, su configuración y su composición tengan un importante papel a este respecto. En ese caso, queda sin explicar por qué el cromosoma X, a pesar de estar marcado intensamente con H3K9me3, muestra retraso en la maduración de su eje de cohesina y no exhibe “DSB”. Sin embargo, no hay que olvidar que el caso del cromosoma X de saltamontes debe estudiarse desde un punto de vista diferente, independiente al de los autosomas, ya que es un univalente. El cromosoma X sigue un patrón meiótico diferente, desde el punto de vista de la cromatina. Tal y como revela la tinción con DAPI el cromosoma X parece estar más condensado en toda la profase I. Es posible que el marcaje del X con H3K9me3 se relacione simplemente con fenómenos de silenciamiento génico.

### **6.3. RAD51, el alineamiento cromosómico y la sinapsis**

Una consecuencia directa de la restricción de las “DSB”, es la polarización de RAD51 (Fig. 49 de resultados). Dichas regiones son además las únicas que presentan alineamiento en cigotena y sinapsis en paquitena. Las regiones cromosómicas que presentan retraso en la maduración del eje de cohesina y no sufren “DSB” ni incorporan RAD51, quedan en paquitena dispersas en el núcleo. Anteriormente hemos deducido que las regiones cromosómicas exentas de “DSB” y de sinapsis son los extremos distales de los bivalentes L1-M8 y el cromosoma X. Tras medir la distancia entre los telómeros distales de dichos bivalentes, comprobamos que la media es de 8.682µm, de lo que se infiere que los telómeros homólogos están muy separados entre sí como para interactuar. Estudios relativos a la organización nuclear de los cromosomas en meiosis apuntan hacia un papel de los telómeros en el proceso de apareamiento previo a la sinapsis y en la formación del bouquet (Harper y col., 2004). Hasta la fecha son desconocidos los factores que regulan que determinadas regiones cromosómicas en los machos de *S. grossum* organicen su eje de cohesina y probablemente su EA con anterioridad al resto y que estas regiones se polaricen en un determinado dominio nuclear, dejando fuera a los extremos distales de 8 bivalentes. Sin embargo, podríamos pensar de nuevo en un importante papel de las cohesinas, ya que se conoce que los mutantes para SMC1β no muestran una organización en “bouquet”, tal y como ocurre en el fenotipo silvestre, sino que algunos de los telómeros permanecen en el interior nuclear (Revenkova y col., 2004). Diversos datos apuntan a que el “bouquet” facilita la sinapsis en tanto en cuanto facilitaría la interacción entre homólogos por cercanía de los extremos cromosómicos (Scherthan y col., 1996; Zickler y Kleckner, 1998; Davis y Smith, 2006). Por otro lado, se ha relacionado al “bouquet” con la recombinación, ya que la formación de dicha configuración nuclear coincide con la aparición de una gran cantidad de focos de RAD51 en meiosis (Ashley y col., 1995; Terasawa y col., 1995; Franklin y col., 1999). En las especies donde el inicio de la recombinación es previo a la sinapsis, se atribuye un papel fundamental a las “DSB” y la incorporación de RAD51 y DMC1 en el alineamiento presináptico y en la correcta formación del CS (revisado en (Gerton y Hawley, 2005). Quizá algo parecido pueda estar ocurriendo en *S. grossum*. El hecho de que las regiones autosómicas asinápticas no presenten focos de RAD51 y



además no muestren alineamiento, hace pensar en la capacidad de RAD51 para la búsqueda de homología.

#### **6.4. Restricción y localización de quiasmas: interferencia.**

En los espermatoцитos de *S. grossum* tan sólo uno de los eventos de recombinación iniciados en leptotena por bivalente (ocasionalmente dos en el bivalente M9) deriva hacia SBC y se manifiesta como quiasma. En los cromosomas más largos del complemento (L1-M8) observamos localización proximal del quiasma único, además de sinapsis parcial. Por el contrario, los bivalentes S11, S10 y M9 no presentan ni localización de quiasmas ni restricción en la sinapsis, ensamblando CS en toda su longitud (Jones y Wallace, 1980). La restricción de la localización de quiasmas en los bivalentes largos, concuerda con las regiones donde se producen las “DSB” en leptotena. En los bivalentes L1-M8 la distancia entre el quiasma único y el centrómero nunca excede la longitud del cromosoma S11 (Perry y Jones, 1974). Además la región que presenta sinapsis en esos bivalentes es comparable en longitud al bivalente S11 (Wallace and Jones, 1978). Por tanto, todo parece indicar que los bivalentes más largos del complemento sólo presentan un quiasma porque ellos se comportan como cromosomas cortos en relación a la región donde se producen “DSB” y donde se ensambla el CS, pudiendo presentar una señal de interferencia similar a la de un cromosoma pequeño. El fenómeno de interferencia se refiere a la restricción que muestran los bivalentes para que dos quiasmas no se localicen muy próximos, contribuyendo de esta forma a que su distribución no al azar (Borodin y col., 2008) La extensión de la señal de interferencia en el bivalente se atribuye a los componentes de los ejes cromosómicos o del CS (Bishop y Zickler, 2004). Por lo tanto, podemos pensar que la formación de un segundo quiasma en los bivalentes L1-M8 estaría inhibida por una estricta regulación de las señales de interferencia. Sin embargo, llegado este punto debemos destacar que frente a la estricta localización de quiasmas observada en los machos, en las hembras de *S. grossum* no se ha observado localización de quiasmas (Perry y Jones, 1974). La razón evolutiva que ha dado lugar a estas diferencias entre ambos sexos de la misma especie es hasta el momento desconocida y serían necesarios estudios más profundos para llegar a entenderla.

### **6.5. La sucesión de acontecimientos en *S. grossum*.**

A modo de resumen de los apartados anteriores y como modelo de trabajo a la vista de nuestros resultados y las evidencias obtenidas por otros autores, podemos especular sobre las relaciones de interdependencia entre la formación del eje de cohesina, las “DSB” y la sinapsis en la meiosis de los machos de *S. grossum*. Así, la maquinaria de formación de “DSB” podría depender de un eje de cohesina y/o un EA maduro, o estar influenciada por la composición y conformación de la cromatina. El reclutamiento de RAD51 dependería de las “DSB” previas. La sinapsis entre cromosomas homólogos podría depender de un eje de cohesina maduro o del reclutamiento de RAD51 tras la generación de “DSB” o de ambas cosas. No podemos olvidar que la regulación de todos estos procesos puede venir dada simplemente por factores genéticos o estar condicionada por la estructura cromosómica.

### **7. Inducción de “DSB” en los machos de *S. grossum***

Como acabamos de ver, los machos de *S. grossum* presentan un modelo de proceso meiótico muy particular. Se ha demostrado que agentes inductores de “DSB” pueden aumentar el número de quiasmas de una especie (Hanneman y col., 1997). La radiación gamma es conocida como una agente físico inductor de “DSB”, que puede incluso restablecer el patrón de recombinación y sinapsis en situaciones de ausencia de SPO11 (Storlazzi y col., 2003). En este sentido, quisimos conocer hasta qué punto la restricción de la sinapsis y la localización de quiasmas deriva de una situación donde las “DSB” no se producen en toda la cromatina y aplicamos un tratamiento de rayos gamma a machos de *S. grossum*. Nuestros resultados muestran que después de irradiarles con una dosis de 5Gy, los núcleos exhiben un marcaje de  $\gamma$ -H2AX distribuido por todo el núcleo (Fig. 55 de resultados). La modificación histónica  $\gamma$ -H2AX señala los lugares de “DSB” en meiosis (Rogakou y col., 1998), por lo tanto nuestros resultados pueden interpretarse en el sentido de que hemos inducido “DSB” en toda la cromatina, incluidas las regiones distales de los 8 cromosomas más largos del complemento (L1-M8). Tras analizar la localización de la recombinasa RAD51, hemos observado que no se distribuye homogéneamente en los núcleos de espermatoцитos irradiados (Fig. 56 de resultados). El dominio nuclear donde más se concentra RAD51

coincide con el marcado por H3K9me3 (Fig. 57 de resultados). A los 5 días después del tratamiento, se observan bivalentes con dos quiasmas y tetravalentes, sin embargo la localización de los quiasmas es mayoritariamente similar a la observada en condiciones naturales (Fig. 60 y 61 de resultados). A continuación discutiremos las consecuencias de inducir “DSB” en toda la cromatina y las posibles causas de la distribución no homogénea de RAD51 y de las restricciones en la localización de quiasmas.

### **7.1. ¿Vías de reparación distintas en regiones donde se han inducido “DSB”?**

La distribución no homogénea de RAD51 en núcleos irradiados hace pesar en un primer momento en la posibilidad de que RAD51 no se incorpore correctamente en todos los lugares donde se han producido “DSB”, distinguiéndose dos dominios nucleares: cromatina donde ocurren “DSB” naturales e inducidas y dominio nuclear donde sólo ocurren “DSB” inducidas. La cromatina donde de forma natural se forman “DSB”, la cual distinguimos por el marcaje de H3K9me3, parece incorporar RAD51 normalmente. Sin embargo, en la región nuclear que sufre exclusivamente “DSB” inducidas o bien no detectamos RAD51 o cuando lo hacemos es a niveles inferiores a los esperados según el daño genético mostrado por el marcaje con  $\gamma$ -H2AX (Figs. 55 y 57 de resultados). La conocida implicación de RAD51 en la reparación de “DSB” en meiosis (Moens y col., 1997; Paull y col., 2000), sugiere de forma directa la siguiente pregunta: ¿se reparan las “DSB” inducidas? Nuestros resultados muestran que evidentemente algunas de esas roturas deben quedar sin reparar, ya que se observan fragmentos cromosómicos y constricciones en la cromatina en todos los días estudiados tras la irradiación. Estos efectos se agudizan a partir del día 6, donde además se distinguen grandes acumulaciones cromosómicas que podrían estar indicando asociaciones entre diferentes cromosomas. Sin embargo, en días anteriores, los efectos observados son relativamente discretos, distinguiéndose la mayoría de las constricciones de la cromatina en regiones distales y no se observan cromatidios sueltos. Estos resultados hacen pensar que las “DSB” naturales e inducidas se reparan en gran medida, al menos en las células que han evolucionado en el día 5 hasta metafase I. Por lo tanto, se nos plantean los siguientes interrogantes: ¿qué vía de reparación usa la célula para reparar las “DSB” inducidas?, ¿estamos ante una dinámica de RAD51 anómala que no

somos capaces de clasificar o bien las roturas se reparan por una vía donde RAD51 no está implicada?, y ¿qué factores pueden estar influyendo en la distribución heterogénea de RAD51 en los núcleos irradiados?

Las principales vías de reparación de “DSB” en eucariotas son la recombinación homóloga (RH) y la unión de extremos no homólogos (UENH, “*non-homologous end joining*”). En meiosis en condiciones naturales la vía principal de reparación es la RH, tomando como molde una cromátida hermana u homóloga y se lleva a cabo mediante fenómenos de invasión de hebra, en los cuales está implicada RAD51. La vía de UENH implica la acción de ADN ligasas y diversos complejos proteicos, no necesita la participación de una hebra hermana u homóloga para usar como molde y no se conoce la participación de RAD51. La reparación por UENH suele llevar asociada un alto grado de fusiones cromosómicas, bien entre regiones de un mismo cromosoma o entre cromosomas homólogos y su cinética de actuación es muy rápida. Por ejemplo en células somáticas humanas, el 80% de las “DSB” producidas por irradiación se reparan en un periodo comprendido entre 20 minutos y 2 horas (Iliakis y col., 2004). Dependiendo del momento del ciclo celular, la vía de reparación principal parece ser diferente. Así, al menos en células de la línea somática de mamíferos, tras un tratamiento con rayos X, en G1 y S temprano se activa la vía de UENH, mientras que en G2 funcionan tanto UENH como RH (Rothkamm y Lobrich, 2003; Mognato y col., 2009). A la vista de nuestros resultados, en las células que entre los días 1 y 5 han alcanzado el estadio de metafase I, consideramos que la vía de UENH no sería la más frecuente. Quizá sí debemos tener más en cuenta esta vía de reparación en las células que han alcanzado el estadio de metafase I a partir del día 6 tras la irradiación, donde la cantidad de asociaciones cromosómicas aumenta considerablemente. Estas asociaciones probablemente apuntan a la formación de fusiones cromosómicas, que serían las responsables de dar ese aspecto “pegajoso” a la cromatina (Fig. 64 de resultados). Si esto fuera así, estaríamos sugiriendo que dependiendo del momento del ciclo celular donde se hayan producido las “DSB” la vía de reparación mayoritaria podría cambiar. Esta situación ha sido postulada por otros autores (Rothkamm y Lobrich, 2003; Mognato y col., 2009). Sin embargo, si consideramos que las primeras células pueden que reparen por vía RH, esto no encaja con el hecho de que no detectemos RAD51

homogéneamente en todo el núcleo (Fig. 56 de resultados). Tampoco estaría de acuerdo con los datos observados en ratón, donde tratamientos con irradiación gamma aumentan el número de focos de RAD51 en leptotena y cigotena, a pesar de observarse también un incremento en la asinapsis (Schoenmakers y col., 2008). Por lo tanto en saltamontes, la reparación de las “DSB” que observamos en las células en metafase I 5 días después de la irradiación sigue sin explicarse de forma adecuada. Cabe la posibilidad de que debido a la acción de un agente externo inductor de “DSB” distinto de SPO11, la dinámica de RAD51 cambie y no hayamos sido capaces de detectarla. La vía de señalización de “DSB” en células somáticas y meióticas en condiciones naturales es similar, implicando la fosforilación de H2AX y la presencia de proteínas como ATR, ATM, MRE11 y RAD50 (revisado en (Marcon y Moens, 2005). Aparentemente, tras la irradiación gamma las “DSB” seguirían una ruta similar de señalización derivada de la presencia de  $\gamma$ -H2AX. La vía de señalización de “DSB” para dar lugar a UENH también implica a ATM, MRE11 y RAD50 pero no a RAD51. Sin embargo, existe una gran diferencia entre las “DBS” inducidas (exógenas) y programas en meiosis (endógenas). Tras la acción de SPO11, esta proteína queda anclada al extremo 5' y es después de su liberación cuando empieza el procesamiento de los extremos libres y la amplificación de la señal de  $\gamma$ -H2AX (Neale y col., 2005). Por lo tanto, desde el momento en que las “DSB” inducidas no son producidas por SPO11, puede que en una situación de exceso de “DSB” se activen vías distintas a las normales. Podríamos pensar que en las “DSB” inducidas se puede activar alguna isoforma de RAD51 que no somos capaces de detectar con el anticuerpo utilizado. En distintas especies se han descrito varios parálogos de RAD51. Estudios “*in vitro*” muestran que alguno de los parálogos de vertebrados, RAD51B y RAD51C, además de interactuar con RAD51 podrían catalizar un intercambio de hebra por si mismos (Lio y col., 2003). Aunque la probabilidad de que existan distintas recombinasas en saltamontes es quizá demasiado especulativa, es una posibilidad que no podemos descartar. Tampoco podemos descartar la activación de vías de reparación donde no esté implicada RAD51. Ni siquiera podemos descartar la implicación de UENH, ya que es la vía de reparación más rápida tras daño genético externo en células somáticas (Iliakis y col., 2004). Son necesarios estudios más profundos para intentar conocer cómo se reparan las “DSB” inducidas en esta especie

de saltamontes y si realmente siguen una vía de reparación distinta a las “DSB” endógenas.

## **7.2. Posibles factores implicados en la distribución heterogénea de RAD51.**

La incorporación de las proteínas de reparación en las “DSB” está influenciada por factores como la conformación y/o accesibilidad de la cromatina, las cohesinas, y en meiosis también por la correcta formación de los EA/EL. Estudios realizados en células humanas en interfase presentan un desfase en la reparación de las “DSB” producidas por radiación ultravioleta, reparándose más rápidamente aquellas regiones cromosómicas que presentan una menor condensación de la cromatina (Falk y col., 2008). En los machos de *S. grossum* hemos observado que el dominio nuclear donde se concentran los focos de RAD51 tras la irradiación con rayos gamma, coincide con el dominio marcado por H3K9me3 (Fig. 57 de resultados). Estos datos indican que la acción de RAD51 se concentra mayoritariamente en una región de la cromatina modificada epigenéticamente, incluso después de haber inducido “DSB” en todo el núcleo. Teniendo en cuenta que en este sistema en condiciones naturales, H3K9me3 coincide con la cromatina que sufre “DSB” en meiosis (Fig. 53 de resultados), podríamos pensar que la composición de la cromatina tendría un papel relevante en la incorporación de RAD51, ya que a pesar de sufrir daño generalizado en el ADN, RAD51 no cambia su distribución principal en el núcleo.

La implicación de las cohesinas en la reparación del ADN puede estar relacionada con la necesidad topológica de la cohesión para mantener las cromátidas hermanas unidas y facilitar así la reparación por vía RH tras la replicación. Por otro lado se ha considerado que las cohesinas podrían contribuir a alcanzar una conformación estructural, adquirida sólo tras la replicación, necesaria para la detección de daño en el ADN, activando así la vía de reparación de las “DSB” (Sjögren y Nasmyth, 2001). Esta última hipótesis se ha visto comprometida cuando se ha observado que los ratones *smc1β<sup>-/-</sup>* muestran una carga normal de RAD51, no así de MLH1 (Revenkova y col., 2004). Sin embargo, el papel de las cohesinas en la reparación del daño en el ADN si parece ir más allá del simple hecho de mantener unidas a las cromátidas hermanas, ya que se ha observado que, por ejemplo, en *S. pombe* los

mutantes de *rad21* muestran defectos en la capacidad para reparar “DSB” o que la cohesina hSMC1 es un sustrato de la kinasa ATM, sugiriendo que la fosforilación de SMC1 es una señal necesaria para la respuesta al daño en el ADN (revisado en (Lehmann, 2005). Esta misma cohesina parece tener un papel crucial en la reparación de “DSB” en *S. cerevisiae*, coordinado en células somáticas las posibles vías de reparación y facilitando la vía de RH en etapas postreplicativas (Schär y col., 2004). Otro hecho comprobado es la incorporación de cohesinas en los lugares de rotura, lo que podría contribuir a reforzar la unión de las cromátidas hermanas para facilitar la reparación homóloga, pero también sugiere que las “DSB” estimulan una incorporación nueva de cohesinas, lo cual dependería de enzimas y modificaciones proteicas que son específicamente activadas como respuesta al daño genético (revisado en (Watrin y Peters, 2006). En nuestro sistema hemos observado una maduración temporalmente diferencial del eje de cohesina en dos dominios nucleares, lo cual podría reflejar una morfogénesis igualmente diferencial de los EA (Fig. 49 de resultados). En meiosis, las proteínas de reparación de las “DSB” se asocian a los EA/EL de los cromosomas (Plug y col., 1998; Tarsounas y col., 1999). También es cierto que la necesidad de estructuras axiales en los cromosomas, como pudiera ser el eje de cohesina, parece ser exclusiva de la meiosis, donde además existe una correlación entre los cambios ocurridos en el ADN, que permitirán la formación de quiasmas, y la progresión de la morfogénesis de los elementos axiales estructurales de los cromosomas (Kleckner, 2006).

Por lo tanto, podemos pensar que la distribución no homogénea de RAD51, a pesar de haberse producido “DSB” en toda la cromatina, podría estar influenciada por el hecho de que las estructuras axiales de los cromosomas, ya sea el eje de cohesina o los EA, no estén completamente formados, o bien porque la cromatina no está modificada o configurada correctamente.

### **7.3. No se observa una situación de sinapsis completa.**

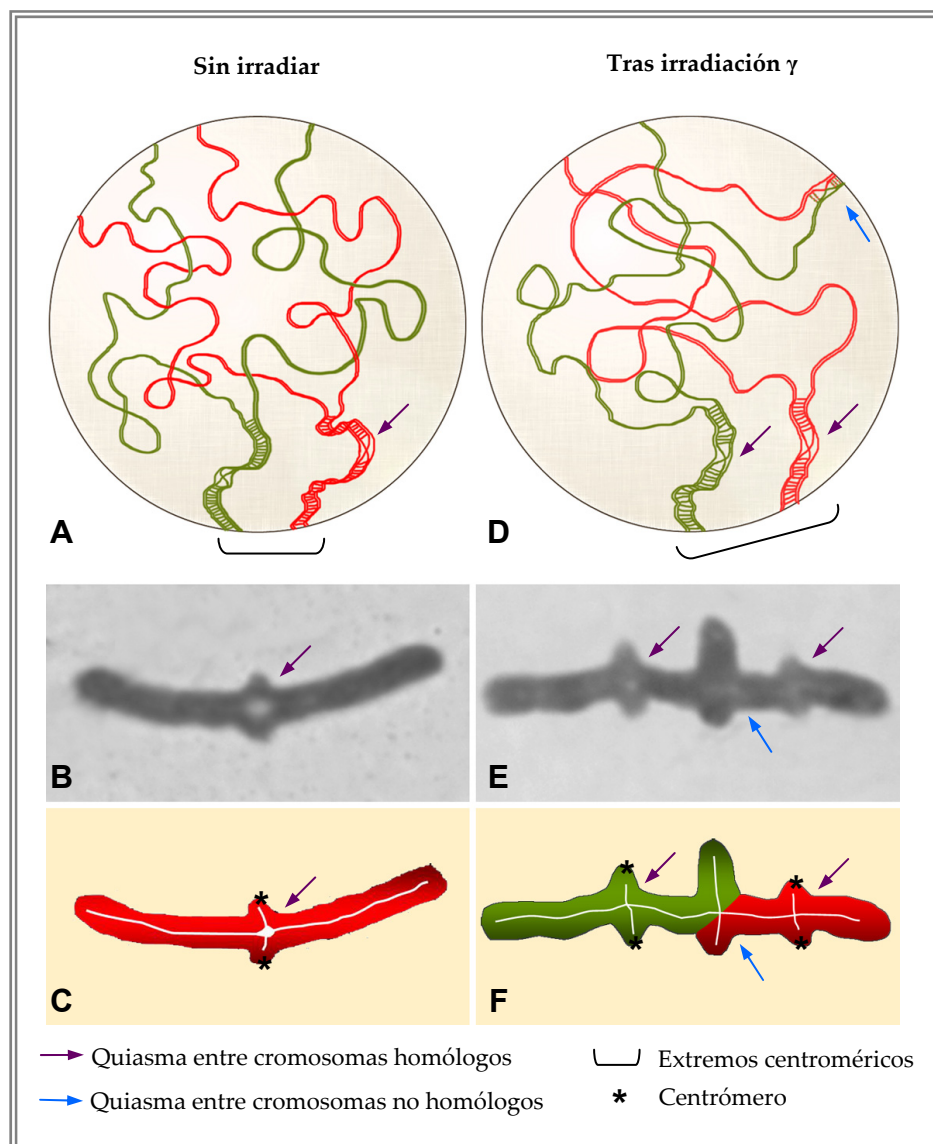
No podemos dejar de mencionar el hecho de que no se observa sinapsis completa tras el tratamiento con rayos gamma. Se sabe que las “DSB” y los fenómenos de invasión de hebra llevados a cabo por RAD51 y DMC1 son cruciales para el progreso de la sinapsis en especies donde el inicio de la recombinación es anterior a la formación

del CS (Ashley y col., 1995; Kleckner, 1996; Keeney y col., 1997; Mahadevaiah y col., 2001; Gerton y Hawley, 2005). En saltamontes hemos observado que las “DSB” se producen con anterioridad al comienzo de la sinapsis y que en aquellas regiones donde están ausentes no se observa ni alineamiento ni sinapsis de cromosomas homólogos (Fig. 48 de resultados). Si después de generar “DSB” en toda la cromatina, no se alcanza una situación de sinapsis completa, podemos pensar que la producción de “DSB” no es el factor limitante para el progreso de la sinapsis en saltamontes, hace falta algo más. Es probable que la organización nuclear esté jugando un papel importante en este fenómeno, ya que las regiones distales de los cromosomas más largos del complemento no exhiben apareamiento y los extremos teloméricos de los homólogos se encuentran muy alejados el uno del otro. Sin olvidar por supuesto, que una de las proteínas implicadas en la búsqueda de homología, RAD51 (Shinohara y Shinohara, 2004), se excluye parcialmente de la región asináptica incluso después del tratamiento con rayos gamma.

#### **7.4. La organización nuclear de los cromosomas no facilita la interacción entre las regiones distales de los cromosomas largos.**

Cinco días después de la irradiación hemos identificado, en 75 metafases I, 17 bivalentes del tipo L1-M8 con dos quiasmas y 19 tetravalentes formados por dos bivalentes del tipo L1-M8 (Tabla 5). Estos datos son especialmente relevantes, ya que en condiciones naturales nunca se observa más de un quiasma ni quiasmas distales en los 8 bivalentes más largos del complemento de los machos de *S. grossum* (Jones, 1971). En los tetravalentes existe un quiasma entre cromosomas no homólogos en posición distal o subdistal y un quiasma proximal entre cada par de homólogos. Sin embargo, nunca observamos un quiasma distal entre homólogos o un quiasma proximal entre cromosomas no homólogos. Este resultado nos hace pensar en la distribución de los cromosomas en el núcleo en profase I. El seguimiento de SMC3 en profase I en aplastados de espermatoцитos en una situación natural nos ha permitido observar que las regiones distales de los cromosomas largos no presentan apareamiento, estando dispersas en el núcleo y sus extremos teloméricos se encuentran muy alejados entre sí (Fig. 42 de resultados y Fig. 76).





**Figura 76: Localización de los quiasmas en bivalentes largos sin irradiar (A, B y C) y en tetravalentes tras irradiación gamma (D, E y F).** A y D: organización del núcleo en paquítena. B y E: tinción con orceína acética de un bivalente largo (B) y un tetravalente (E) en metafase I. C y F: esquemas de las imágenes de B y E respectivamente. Una pareja de cromosomas homólogos se ha dibujado en verde y otra en rojo. Los corchetes en A y B marca la posición de los extremos centroméricos de los cromosomas. Los asteriscos negros marcan la posición de los centrómeros en los esquemas de los tetravalentes en C y D. En una situación control, sin irradiar, en un núcleo en paquítena los extremos distales de los cromosomas largos se encuentran dispersos en una región nuclear (A) mientras en las regiones proximales se forma un quiasma por bivalente (flechas moradas), el cual se visualiza en metafase I (B y C). Tras la irradiación (D), algunas de las "DBS" inducidas en las regiones distales de los cromosomas largos dan lugar a un quiasma entre dos cromosomas no homólogos (flecha azul). Esto da lugar a tetravalentes con dos quiasmas proximales entre homólogos y un quiasma distal entre cromosomas no homólogos (E y F).

Estos extremos asinápticos no forman parte del "bouquet" en cigotena y en el caso de que uno de los extremos distales esté incluido en ese ramillete, el extremo distal homólogo no lo está. Por lo tanto, la especial disposición de los cromosomas largos no parece facilitar la interacción entre los homólogos en las regiones distales. Este hecho

podría explicar la ausencia de quiasmas distales entre cromosomas homólogos tras el tratamiento con rayos gamma. Sin embargo, puede que esta disposición espacial permita que dos extremos distales de dos cromosomas largos no homólogos estén próximos. Por lo tanto la probabilidad de interacción entre regiones distales de cromosomas no homólogos sería mayor que entre cromosomas homólogos, dando lugar en ocasiones a un quiasma en una situación de exceso de “DSB”. La presencia de quiasmas distales en los cromosomas L1-M8, aunque sea entre cromosomas no homólogos, sugiere que al menos algunas de las “DSB” ocurridas en dichas regiones cromosómicas son probablemente reparadas por vía RH, donde RAD51 debe ser incorporada y cuya resolución deriva hacia SBC

#### **7.5. La presencia de tetravalentes y bivalentes con dos quiasmas indican el ritmo de la recombinación y la meiosis.**

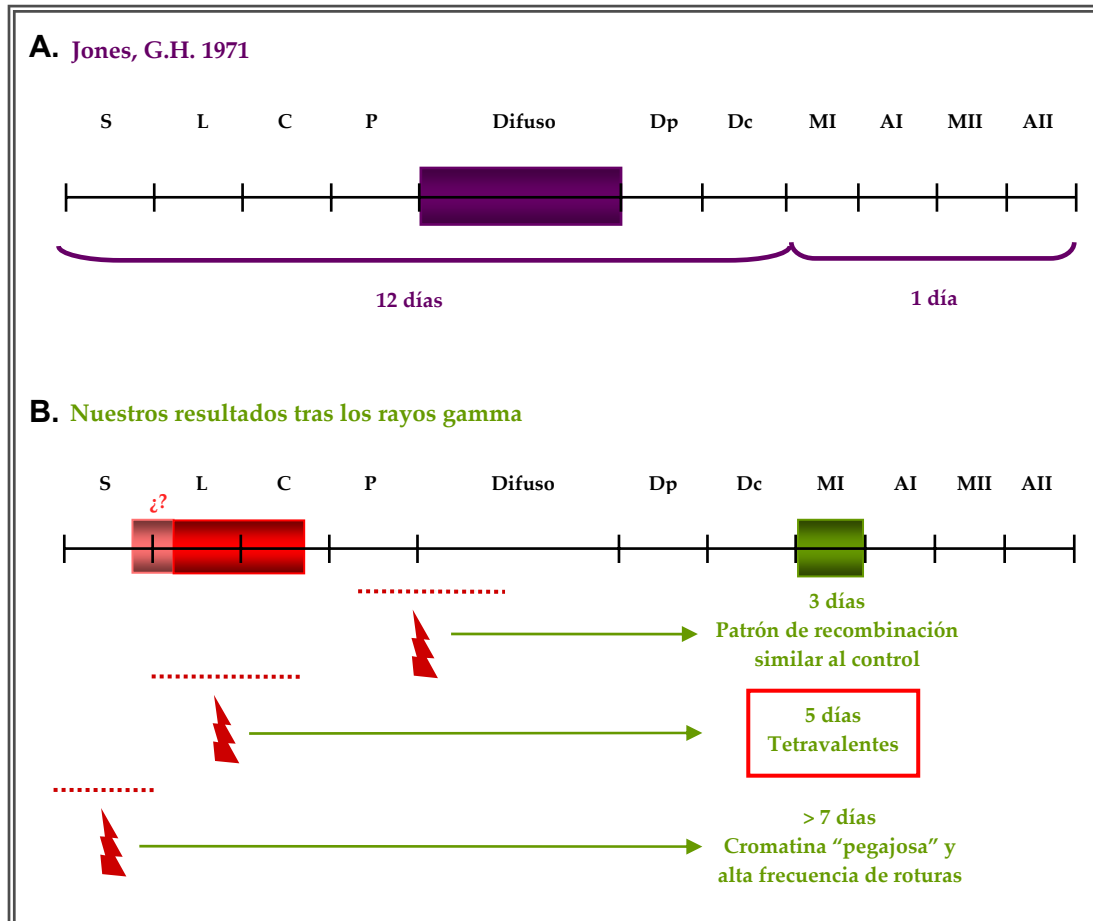
En 1971, Gareth H. Jones describió en machos de *S. grossum* que mientras las células que se encontraban en metafase I tardan tan sólo 24 horas en alcanzar la etapa de anafase II, aquellos espermatocitos que se encuentran en la etapa S premeiótica tardan 12 días en llegar a metafase I, definiendo además que la mayoría del tiempo estaría ocupado por un estadio de difuso, el cual se encuentra entre paquitena y diplotena (Jones, 1971). Sin embargo, este autor no especificó la duración de cada una de las etapas de la profase I. En nuestro caso además, tampoco sabemos si las condiciones en las que han sido tratados los individuos podrían afectar la duración de la meiosis o de algunas de sus etapas. No obstante, la estricta localización de quiasmas presente en la meiosis de los machos de esta especie, facilita el estudio de los posibles cambios ocurridos en el patrón de recombinación recíproca. Si los machos de *S. grossum* capturados en poblaciones españolas y tratados con rayos gamma siguieran la secuencia temporal descrita anteriormente, esperaríamos observar en metafase I algún cambio en el patrón de recombinación alrededor de 12 días después de irradiarlos, quizá un poco antes ya que la secuencia de la meiosis esta descrita desde la etapa S premeiótica. Cuando nos referimos a cambios en el patrón de recombinación, queremos decir que ha habido algún cambio en el número o localización de quiasmas, por lo tanto esto podría ser traducido como que las “DSB” inducidas han afectado a la

recombinación recíproca. Nuestros resultados muestran que los primeros cambios en el patrón de recombinación se observan en metafase I 5 días después de la irradiación, cuando se observan bivalentes largos con dos quiasmas y tetravalentes (Fig. 60 de resultados). En días anteriores no se distingue ningún indicio de cambio en la localización ni en el número de quiasmas. Desde el día 1 hasta el día 12 sí se distinguen constricciones en la cromatina y fragmentos cromosómicos, que son la manifestación citológica de daños producidos en la cromatina y no reparados. A partir de día 6 no somos capaces de distinguir cromosomas individualizados. Los tetravalentes observados el día 5 están formados por dos parejas de cromosomas homólogos tipo L1-M8, las cuales comparten un quiasma distal (Fig. 77). Para formar un tetravalente de este tipo, consideramos que deben coincidir dos situaciones: i) Por un lado deben haberse producido “DSB” en regiones distales de los cromosomas largos, ésta sería una prueba de que hemos inducido “DSB” en regiones donde de forma natural no se producen; ii) la segunda condición que debería cumplirse, es que algunas de las “DSB” inducidas deben ser tratadas por la vía de RH hacia SBC. En este punto debemos manejar tres datos:

- i) La recombinación meiótica se inicia mediante “DSB” (Keeney y col., 1997).
- ii) En saltamontes, las primeras “DSB” en condiciones naturales se detectan en leptotena y se incrementan considerablemente en cigotena (esta memoria).
- iii) Los fenómenos de invasión de hebra, para dar lugar a los intermediarios de la recombinación, ocurren en cigotena (Börner y col., 2004) y la decisión hacia SBC o NSBC ocurre muy tempranamente en el progreso de la recombinación, incluso antes de la estabilización de los intermediarios de la recombinación (Bishop y Zickler, 2004).

Teniendo en cuenta todas estas premisas y nuestros resultados, consideramos que el estadio meiótico donde las “DSB” generadas por los rayos gamma podrían concluir en fenómenos de recombinación recíproca, sería entre leptotena y cigotena. No obstante, no podemos descartar que las “DSB” inducidas un poco antes de leptotena también siguieran esa vía de reparación. Por lo tanto, si observamos tetravalentes y bivalentes largos con dos quiasmas en metafase I en el día 5 tras la irradiación, consideramos que el tiempo requerido por los espermatoцитos desde leptotena-cigotena hasta metafase I sería de cinco días, al menos bajo nuestras condiciones de trabajo (Fig.

77). Si la irradiación ha afectado a espermatocitos en etapas posteriores al punto de decisión entre SBC y NSBC, por lo tanto a partir de cigotena tardía - paquitena, no observaríamos cambios en el patrón de recombinación. En este caso, serían las células analizadas entre los días 1 y 3.



**Figura 77: Duración de la meiosis en los machos de *S. grossum*.** En este esquema se muestra la duración de la meiosis en los machos de *S. grossum* descrita por Jones en 1971 (A) y las evidencias que hemos observado en el laboratorio tras la irradiación con rayos gamma (B). (A) Jones describió que los meiocitos tardaban 12 días en alcanzar la etapa de metafase I desde el periodo S premeiótico, donde una gran parte del tiempo era ocupado por el estado de difuso. (B) En nuestro trabajo hemos analizado que tras la irradiación con 5Gy de rayos gamma (rayo rojo), a los 3 días no observamos cambios en el patrón de recombinación, indicando que posiblemente los rayos gamma puedan haber afectado a espermatocitos en etapas posteriores a la decisión entre SBC y NSBC en la recombinación meiótica. A los 5 días observamos tetravalentes y bivalentes con dos quiasmas, indicando que las “DSB” podrían haberse producido en leptotena/cigotena. En días sucesivos sólo se observan fragmentos de cromatina y cromosomas rotos, lo que hace pensar que las “DSB” se han producido con anterioridad al inicio de la meiosis (leer texto para obtener más detalles del argumento). S: periodo de replicación; L: leptotena; C: cigotena; P: paquitena; Dp: diplotena; Dc: diacinesis; MI: metafase I; AI: anafase I; MII: metafase II; AII: anafase II.

Por otro lado, los cromosomas en metafase I observados a partir del día 7 presentan una gran cantidad de roturas cromosómicas y un alto grado de “pegajosidad” en la cromatina. Esto podría explicarse si pensamos que el daño de la

irradiación se ha producido en etapas premeióticas y cabe pensar por tanto que las células han sido incapaces de reparar el exceso de “DSB” o bien que se han reparado por una vía donde no se ha tenido en cuenta la homología de la secuencia, ni la corrección de errores. Además, el análisis de las espermátidas hace pensar que 5 días después de la irradiación probablemente todavía no estemos viendo los efectos de los rayos gamma traducidos en espermátidas anómalas y es a partir del día 8 cuando las células irradiadas, probablemente durante alguna etapa de la meiosis, llegan a espermátida media.

#### **7.6. La regulación de la recombinación en los machos de *S. grossum* va más allá de la producción de “DSB”.**

Analizando todos los datos en conjunto, llegamos a la conclusión de que los mecanismos de regulación de la recombinación en los machos de *S. grossum* es tan estricto, que a pesar de inducir exógenamente “DSB”, el patrón de sinapsis y SBC, en cuanto a localización y número de quiasmas no varía mucho de una situación normal. Así, debemos tener en cuenta varios factores: i) la maduración del eje de cohesina no es uniforme en el núcleo y está relacionada con la restricción de los lugares de “DSB” en situación natural; ii) la distribución de RAD51 no es homogénea a pesar de haber producido “DSB” en toda la cromatina; iii) la cromatina que presenta H3K9me3 está relacionada con los lugares de producción de las “DSB” en condiciones naturales y con las regiones donde se detecta RAD51 en condiciones normales y tras los rayos gamma; iv) la disposición espacial de los cromosomas en el núcleo no beneficia la interacción entre las regiones distales homólogas de los cromosomas largos (L1-M8). De todos estos resultados se puede inferir que el simple hecho de producir artificialmente “DSB” no implica apareamiento ni sinapsis en las regiones que en situaciones normales carecen de estas características. La organización nuclear de los cromosomas y la composición de la cromatina, previa a las “DSB”, probablemente tienen un papel fundamental en la posterior recombinación y sinapsis. Más allá de un simple estudio de los cambios en la localización y el número de quiasmas tras la irradiación con rayos gamma en *S. grossum*, este trabajo nos ha permitido discutir sobre la importancia de las estructuras

axiales de los cromosomas (eje de cohesina y EA), la composición de la cromatina y la disposición de los cromosomas en el núcleo en la recombinación meiótica.







El conjunto de los resultados detallados en la presente Tesis Doctoral nos ha permitido establecer las siguientes conclusiones relativas a la meiosis de saltamontes:

1. La incorporación secuencial de las cohesinas SMC (SMC3 y SMC1 $\alpha$ ) y las no SMC (RAD21 y SA1) en profase I, su distribución diferencial en metafase I y una liberación no homogénea de las mismas, nos lleva a proponer la existencia de diferentes complejos de cohesina.
2. La localización de los complejos de cohesina en los cromosomas meióticos cambia en la etapa de diplotena.
3. La distribución de cohesinas en metafase I está relacionada con la historia sináptica de los cromosomas en profase I.
4. Los fenómenos de inicio de la recombinación preceden al comienzo de la sinapsis.
5. El patrón de sinapsis parcial y localización de quiasmas presentado por los machos de *S. grossum*, está relacionado con una maduración diferencial del eje de cohesina, restricción de las “DSB” meióticas y podría estar influenciado por la composición de la cromatina.
6. La inducción exógena de “DSB” en los machos de *S. grossum* no deriva necesariamente en la incorporación de RAD51 y no concluye en sinapsis completa.
7. La inducción exógena de “DSB” en los machos de *S. grossum* no cambia la localización de los quiasmas entre cromosomas homólogos.
8. La organización nuclear de los cromosomas y determinadas modificaciones de la cromatina pueden ser dos factores importantes en la regulación de la meiosis en los machos de *S. grossum*.



The combination of all results of this Thesis, lead us to the following conclusions in relation to grasshopper meiosis:

1. The sequential loading of cohesins SMC (SMC3 and SMC1 $\alpha$ ) and cohesins non-SMC (RAD21 and SA1) in prophase I, their differential distribution in metaphase I and their non-homogenous releasing, points to the existence of different cohesin complexes.
2. The location of cohesin complexes in meiotic chromosomes changes in the diplotene stage.
3. The cohesin distribution in metaphase I is related to the synaptic history of chromosomes during prophase I.
4. The events in the initial stages of meiotic recombination occur before the initiation of synapsis.
5. The partial synapsis and chiasma localization observed in males of *S. grossum* are correlated with a non-homogenous maturation of the cohesin axis and the restriction of meiotic DSBs, and perhaps influenced by the chromatin composition.
6. The exogenous induction of DSBs does not result in a homogenous pattern of RAD51 recruitment and do not lead to complete synapsis in males of *S. grossum*.
7. The exogenous induction of DSBs in males of *S. grossum* does not change the chiasma localization between homologous chromosomes.
8. The nuclear organization of chromosomes and the chromatin modifications could be two relevant factors for the regulation of meiosis in males of *S. grossum*.







## ***Material suplementario ofrecido en CD:***

- Copia en formato PDF de la Tesis Doctoral: *Interrelaciones del complejo de cohesina, la recombinación y la sinapsis en la meiosis de Ortópteros*.
- Copia en formato PDF de los artículos publicados a partir de los resultados mostrados en la Tesis Doctoral.
- Vídeos en formato “Quick Time”.

## **Leyendas de los vídeos:**

**Video 01. Tinción con DAPI sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** Reconstrucción tridimensional de un campo de espermatoцитos tras el aplastado de varios túbulos seminíferos de *L. migratoria*. La técnica del aplastado permite obtener una monocapa celular donde se distinguen espermatoцитos en distintos estadios de la división meiótica.

**Video 02. Doble inmunolocalización de SMC3 y RAD51 en un campo de espermatoцитos de *L. migratoria*.** Reconstrucción tridimensional de un campo de espermatoцитos obtenidos tras el aplastado de varios túbulos seminíferos de *L. migratoria*. La inmunodetección de SMC3 se muestra en verde y la de RAD51 en rojo.

**Video 03. Reconstrucción tridimensional de espermatoгонias tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 10B. En esta etapa de la meiosis SMC3 revela un patrón difuso pero uniforme en la cromatina.

**Video 04. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en preleptotena tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 10D. Se detectan trazos discontinuos de SMC3 en el núcleo.

**Video 05. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en leptotena tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 10F. SMC3 define finos ejes en todo el núcleo.

**Video 06. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en la etapa de cigotena temprana tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 10H. Se distinguen dos regiones de inicio de sinapsis donde los filamentos de SMC3 comienzan a asociarse por parejas.

**Video 07. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en la etapa de cigotena media tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 10J. Se distingue la configuración en “bouquet”, así como las regiones donde se está completando la sinapsis por la asociación en parejas de los filamentos de SMC3.

**Video 08. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en paquitena tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** Todos los ejes de SMC3 se muestran gruesos, excepto el del cromosoma X (parte inferior del núcleo). La proyección de los planos se muestra en la figura 10L.

**Video 09. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en diplotena tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 12B. Los ejes de SMC3 adquieren una configuración irregular a lo largo de su recorrido en los autosomas.

**Video 10. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en la etapa de diacinesis tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La proyección de los planos se muestra en la figura 12D. SMC3 se detecta en el dominio intercromatídico de los cromosomas.

**Video 11. Reconstrucción tridimensional de un campo donde se distinguen 5 prometaфases I y una paquitena (esquina inferior derecha) tras la inmunolocalización de SMC3 en aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La inmunolocalización de SMC3 se muestra en rojo y la cromatina en azul por la tinción con DAPI. La cohesina SMC3 se localiza en el dominio intercromatídico de los cromosomas en prometaфase I y forma filamentos lineales en paquitena.

**Video 12. Reconstrucción tridimensional de una metafase I tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La inmunodetección de SMC3 está en rojo sobre la tinción de la cromatina en azul con DAPI. El cromosoma que está fuera de placa en la esquina superior derecha de la imagen corresponde al univalente natural X. La subunidad SMC3 se localiza en el dominio intercromatídico de todos los cromosomas.

**Video 13. Composición de la reconstrucción tridimensional desde diferentes puntos de vista de un bivalente en metafase I de *L. migratoria* tras la inmunolocalización de SMC3 en aplastados de espermatoцитos.** La inmunodetección de SMC3 se muestra en verde y la cromatina está pseudocoloreada en rojo a partir de la señal observada con la tinción con DAPI. En la visión fontral (frontal view) se detecta que SMC3 marca el dominio intercromatídico del bivalente y se interrumpe su señal en el punto de quiasma (flecha negra). En la visión lateral (lateral view) y desde arriba (top view) se observa como la señal de SMC3 abarca el grosor del espacio entre cromátidas hermanas pero a parches y describiendo una señal ligeramente en zig-zag. En el centro se muestra la reconstrucción tridimensional del bivalente en un giro de 360° en el eje Y y en el X.

**Video 14. Detalle de un bivalente en metafase de *E. plorans* tras la inmunolocalización de SA1 sobre aplastados de espermatoцитos.** La señal de SA se reveló en verde. Esta cohesina se localiza en los centrómeros y el dominio intercromatídico, interrumpiéndose la señal en el punto de quiasma.

**Video 15. Reconstrucción de un núcleo en paquitena tras la inmunolocalización de RAD21 en aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La inmunodetección de RAD21 se observa en verde sobre la cromatina que ha sido teñida en azul con DAPI. RAD21 forma filamentos continuos por todo el núcleo pero no se detecta en la cromatina del cromosoma X (mancha heteropícnótica positiva en la periferia superior del núcleo).

**Video 16. Reconstrucción tridimensional de dos bivalentes en metafase I tras la inmunolocalización de RAD21 en aplastados de espermatoцитos de *L. migratoria*.** La señal de RAD21 se muestra en verde y se localiza en dominio intercromatídico en un patrón a parches. Se interrumpe en el punto de quiasma. No se acumula en los centrómeros.

**Video 17. Composición de la reconstrucción tridimensional desde diferentes puntos de vista de un bivalente en metafase I de *L. migratoria* tras la inmunolocalización de RAD21 en aplastados de espermatoцитos.** La inmunodetección de RAD21 se muestra en verde y la cromatina está pseudocoloreada en rojo a partir de la señal observada con la tinción con DAPI. En la visión fontral (frontal view) se detecta que RAD21 marca el dominio intercromatídico del bivalente y se interrumpe su señal en el punto de quiasma (flecha negra). En la visión lateral (lateral view) y desde arriba (top view) se observa como la señal de RAD21 abarca el grosor del espacio entre cromátidas hermanas pero a parches y describiendo una señal ligeramente en zig-zag. En el centro se muestra la reconstrucción tridimensional del bivalente en un giro de 360° en el eje Y y en el X. Esta señal es igual en la inmunodetección de SMC1α, por eso en la leyenda del video aparece SMC.

**Video 18. Reconstrucción tridimensional de un campo de espermatoцитos de *L. migratoria* tras la inmunolocalización de SMC3 y RAD21 sobre aplastados.** SMC3 se observa en rojo y RAD21 en verde. En la imagen distinguimos dos paquitenas (pachytene), una cigotena (zygotene) y dos leptotenas (leptotene). En leptotena sólo se detecta SMC3. En cigotena RAD21 y SMC3 colocalizan en la zona de sinapsis. En paquitena RAD21 y SMC3 configuran filamentos en todo en el núcleo sobre los cuales su señal colocaliza.

**Video 19. Reconstrucción tridimensional de un campo de espermatoцитos de *L. migratoria* tras la inmunolocalización de SMC3 y RAD21 sobre aplastados.** SMC3 se observa en rojo y RAD21 en verde. A la izquierda de la imagen se distingue una paquitena temprana (early pachytene). Además se observa una paquitena media (mid pachytene), dos cigotenas (zygotene), una diplotena (diplotene) y hemos señalado dos espermátidas a la izquierda del campo (spermatids).

**Video 20. Composición de la reconstrucción tridimensional desde diferentes puntos de vista de un bivalente en metafase I de *L. migratoria* tras la doble inmunolocalización de SMC3 y RAD21 en aplastados de espermatoцитos.** La localización de RAD21 se observa en verde y la de la cohesina SMC3 en rojo. La cromatina aparece en azul por la tinción con DAPI. En la visión frontal (frontal view) se observa la señal de la subunidad SMC3 (arriba en rojo) y la subunidad RAD21 (abajo en verde). La superposición de ambas SMC3 y RAD21 con el DAPI se muestra en un recuadro interior en cada una de las imágenes de la vista frontal. En la vista lateral (lateral view) y desde arriba (top view) se muestran imágenes de la superposición de la señal de SMC3 y RAD21, identificándose regiones verdes, rojas y amarillas. En el centro de la imagen se observa la reconstrucción tridimensional, en un giro de 360° en el eje Y y en el X, del bivalente con la superposición de la señal de RAD21 y SMC3. En un recuadro interior de esta reconstrucción se muestra la superposición de la doble inmunodetección con el DAPI.



**Vídeo 21. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en paquitena tras la inmunodetección de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de un individuo de *E. plorans* portador de un cromosoma B.** La señal de SMC3 se muestra en verde. Esta subunidad de cohesina en paquitena da lugar a 11 filamentos gruesos y dos finos, correspondientes al cromosoma X y al B (en la parte inferior del núcleo).

**Vídeo 22. Reconstrucción tridimensional de un núcleo en paquitena de *S. grossum* tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos.** La señal de SMC3 se detecta en verde. La región agrandada muestra el detalle de la zona de intercambio entre la región de sinapsis (filamento grueso de SMC3, flechas blancas) y la zona de asinapsis (filamentos finos de SMC3 que se dispersan en el núcleo, flechas rojas). Los telómeros están indicados (Tel.) La cabeza de flecha roja indica el punto de cambio de patrón sináptico.

**Vídeo 23. Seguimiento de dos bivalentes largos tras la inmunolocalización de SMC3 sobre aplastados de espermatoцитos de *S. grossum*.** La detección de SMC3 se muestra en blanco y negro. Las líneas rojas y verdes corresponden a la trayectoria de dos bivalente largos. La zona más gruesa corresponde a la región sinapsada y la zona de filamentos fino que se abren corresponden a los extremos asinápticos. La reconstrucción se hizo a partir de 60 planos focales obtenidos tras el aplastado de espermatoцитos. El seguimiento de los bivalentes se realizó plano a plano antes de montar la reconstrucción en 3D.

**Vídeo 24. Reconstrucción tridimensional de una leptotena tras la doble inmunodetección de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX sobre aplastados de espermatoцитos de *S. grossum*.** En verde se muestra la subunidad de cohesina SMC3 y en rojo  $\gamma$ -H2AX. La cromatina se tiñó con DAPI y se observa en azul. El cromosoma X se marca sobre la cromatina. La inmunolocalización de SMC3 muestra una región más avanzada en la formación del eje de cohesina, sobre la cual se detecta la señal de  $\gamma$ -H2AX.

**Vídeo 25. Reconstrucción tridimensional de una paquitena tras la doble inmunodetección de SMC3 y  $\gamma$ -H2AX sobre aplastados de espermatoцитos de *S. grossum*.** En verde se muestra la subunidad de cohesina SMC3 y en rojo  $\gamma$ -H2AX. La cromatina se tiñó con DAPI y se observa en azul. El cromosoma X se marca sobre la cromatina. La inmunolocalización de SMC3 evidencia la sinapsis parcial, mostrando una región de filamentos gruesos, sobre los que se localizan los focos de  $\gamma$ -H2AX, y una región de filamentos finos donde no se detectan puntos de  $\gamma$ -H2AX. El cromosoma X presenta un eje de SMC3 fino.







- Abdelaziz, M., Teruel, M., Chobanov, D., Camacho, J. P. y Cabrero, J.** (2007). Physical mapping of rDNA and satDNA in A and B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* from a Greek population. *Cytogenet Genome Res* **119**, 143-6.
- Allers, T. y Lichten, M.** (2001). Differential timing and control of noncrossover and crossover recombination during meiosis. *Cell* **106**, 47-57.
- Amos, A. y Dover, G.** (1981). The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* **81**, 673-90.
- Anderson, L. K., Hooker, K. D. y Stack, S. M.** (2001). The distribution of early recombination nodules on zygotene bivalents from plants. *Genetics* **159**, 1259-69.
- Arumugam, P., Gruber, S., Tanaka, K., Haering, C. H., Mechtler, K. y Nasmyth, K.** (2003). ATP hydrolysis is required for cohesin's association with chromosomes. *Curr Biol* **13**, 1941-53.
- Ashley, T., Plug, A. W., Xu, J., Solari, A. J., Reddy, G., Golub, E. I. y Ward, D. C.** (1995). Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma* **104**, 19-28.
- Bähler, J., Wyler, T., Loidl, J. y Kohli, J.** (1993). Unusual nuclear structures in meiotic prophase of fission yeasts: a cytological analysis. *Journal of Cell Biology* **121**.
- Barlow, A. L., Benson, F. E., West, S. C. y Hulten, M. A.** (1997). Distribution of the Rad51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *Embo J* **16**, 5207-15.
- Baudat, F., Manova, K., Yuen, J. P., Jasin, M. y Keeney, S.** (2000). Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11. *Mol Cell* **6**, 989-98.
- Bellani, M. A., Romanienko, P. J., Cairatti, D. A. y Camerini-Otero, R. D.** (2005). SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*<sup>-/-</sup> spermatocytes. *J Cell Sci* **118**, 3233-45.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P. C., Nicolas, A. y Forterre, P.** (1997). An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature* **386**, 414-7.
- Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. y Kleckner, N.** (1992). DMC1: a meiosis-specific yeast homolog of *E. coli* recA required for recombination, synaptonemal complex formation, and cell cycle progression. *Cell* **69**, 439-56.
- Bishop, D. K. y Zickler, D.** (2004). Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. *Cell* **117**, 9-15.
- Borde, V., Goldman, A. S. y Lichten, M.** (2000). Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* **290**, 806-9.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Geli, V. y Nicolas, A.** (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *Embo J* **28**, 99-111.
- Börner, G. V., Kleckner, N. y Hunter, N.** (2004). Crossover/noncrossover differentiation, synaptonemal complex formation, and regulatory surveillance at the leptotene/zygotene transition of meiosis. *Cell* **117**, 29-45.
- Borodin, P. M., Basheva, E. A. y Zhelezova, A. I.** (2008). Immunocytological analysis of meiotic recombination in the American mink (*Mustela vison*). *Anim Genet*.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. y Chen, D. J.** (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* **276**, 42462-7.
- Cabrero, J., Bakkali, M., Bugrov, A., Warchalowska-Sliwa, E., Lopez-Leon, M. D., Perfectti, F. y Camacho, J. P.** (2003). Multiregional origin of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* **112**, 207-11.
- Cabrero, J., López-León, M. D., Bakkali, M. y Camacho, J. P.** (1999). Common origin of B chromosome variants in the grasshopper *eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **83**, 435-9.
- Cabrero, J., Teruel, M., Carmona, F. D., Jiménez, R. y Camacho, J. P.** (2007). Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenet Genome Res* **119**, 135-42.
- Calvente, A., Viera, A., Page, J., Parra, M. T., Gómez, R., Suja, J. A., Rufas, J. S. y Santos, J. L.** (2005). DNA double-strand breaks and homology search: inferences from a species with incomplete pairing and synapsis. *J Cell Sci* **118**, 2957-63.
- Camacho, J. P., Sharbel, T. F. y Beukeboom, L. W.** (2000). B-chromosome evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 163-78.
- Canudas, S. y Smith, S.** (2009). Differential regulation of telomere and centromere cohesion by the Scc3 homologues SA1 and SA2, respectively, in human cells. *J Cell Biol*.

- Carlson, B. M.** (2000). Embriología Humana y Biología del Desarrollo. Ediciones Harcourt S.A.
- Ciosk, R., Zachariae, W., Michaelis, C., Shevchenko, A., Mann, M. y Nasmyth, K.** (1998). An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell* **93**, 1067-76.
- Clarke, A. S., Tang, T. T., Ooi, D. L. y Orr-Weaver, T. L.** (2005). POLO kinase regulates the Drosophila centromere cohesion protein MEI-S332. *Dev Cell* **8**, 53-64.
- Cooke, C. A., Heck, M. M. y Earnshaw, W. C.** (1987). The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol* **105**, 2053-67.
- Costa, Y. y Cooke, H. J.** (2007). Dissecting the mammalian synaptonemal complex using targeted mutations. *Chromosome Res* **15**, 579-89.
- Costa, Y., Speed, R., Ollinger, R., Alsheimer, M., Semple, C. A., Gautier, P., Maratou, K., Novak, I., Hoog, C., Benavente, R. y col.** (2005). Two novel proteins recruited by synaptonemal complex protein 1 (SYCP1) are at the centre of meiosis. *J Cell Sci* **118**, 2755-62.
- Cromie, G. A. y Smith, G. R.** (2007). Branching out: meiotic recombination and its regulation. *Trends Cell Biol* **17**, 448-55.
- Chan, R. C., Chan, A., Jeon, M., Wu, T. F., Pasqualone, D., Rougvie, A. E. y Meyer, B. J.** (2003). Chromosome cohesion is regulated by a clock gene paralogue TIM-1. *Nature* **423**, 1002-9.
- Chang, C. C., Dearden, P. y Akam, M.** (2002). Germ line development in the grasshopper *Schistocerca gregaria*: vasa as a marker. *Dev Biol* **252**, 100-18.
- Chicheportiche, A., Bernardino-Sgherri, J., de Massy, B. y Dutrillaux, B.** (2007). Characterization of Spo11-dependent and independent phospho-H2AX foci during meiotic prophase I in the male mouse. *J Cell Sci* **120**, 1733-42.
- Church, K. y Wimber, D. E.** (1969). Meiosis in the grasshopper: chiasma frequency after elevated temperature and x-rays. *Can J Genet Cytol* **11**, 209-16.
- Davis, L. y Smith, G. R.** (2006). The meiotic bouquet promotes homolog interactions and restricts ectopic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **174**, 167-77.
- de la Fuente, R., Parra, M. T., Viera, A., Calvente, A., Gómez, R., Suja, J. A., Rufas, J. S. y Page, J.** (2007). Meiotic pairing and segregation of achiasmate sex chromosomes in eutherian mammals: the role of SYCP3 protein. *PLoS Genet* **3**, e198.
- de Massy, B.** (2003). Distribution of meiotic recombination sites. *Trends Genet* **19**, 514-22.
- de Vries, F. A., de Boer, E., van den Bosch, M., Baarends, W. M., Ooms, M., Yuan, L., Liu, J. G., van Zeeland, A. A., Heyting, C. y Pastink, A.** (2005). Mouse Sycp1 functions in synaptonemal complex assembly, meiotic recombination, and XY body formation. *Genes Dev* **19**, 1376-89.
- Dearden, P. K. y Akam, M.** (2001). Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: wingless, decapentaplegic and caudal expression. *Development* **128**, 3435-44.
- del Cerro, A. L., Fernandez, A. y Santos, J. L.** (1996). Chiasma localization, heterochromatin and synaptonemal complexes in the grasshopper *Pyrgomorpha conica*. *Chromosome Res* **4**, 69-75.
- Denison, S. H., Kafer, E. y May, G. S.** (1993). Mutation in the bimD gene of *Aspergillus nidulans* confers a conditional mitotic block and sensitivity to DNA damaging agents. *Genetics* **134**, 1085-96.
- Dernburg, A. F., McDonald, K., Moulder, G., Barstead, R., Dresser, M. y Villeneuve, A. M.** (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* **94**, 387-98.
- Dobson, M. J., Pearlman, R. E., Karaiskakis, A., Spyropoulos, B. y Moens, P. B.** (1994). Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* **107** (Pt 10), 2749-60.
- Downs, J. A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S. J., Jackson, S. P. y Cote, J.** (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. *Mol Cell* **16**, 979-90.
- Earnshaw, W. C., Halligan, B., Cooke, C. A., Heck, M. M. y Liu, L. F.** (1985). Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* **100**, 1706-15.
- Earnshaw, W. C. y Laemmli, U. K.** (1984). Silver staining the chromosome scaffold. *Chromosoma* **89**, 186-92.
- Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. y Jessberger, R.** (2000). Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiotic chromosomes and synaptonemal complexes. *J Cell Sci* **113** (Pt 4), 673-82.
- Eijpe, M., Offenberger, H., Jessberger, R., Revenkova, E. y Heyting, C.** (2003). Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1beta and SMC3. *J Cell Biol* **160**, 657-70.

- Eissenberg, J. C. y Elgin, S. C.** (2000). The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **10**, 204-10.
- Esponda, P. y Giménez-Martín, G.** (1972). The attachment of the synaptonemal complex to the nuclear envelope. An ultrastructural and cytochemical analysis. *Chromosoma* **38**, 405-17.
- Fabian, L. y Forer, A.** (2007). Possible roles of actin and myosin during anaphase chromosome movements in locust spermatocytes. *Protoplasma* **231**, 201-13.
- Falck, J., Coates, J. y Jackson, S. P.** (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605-11.
- Falk, M., Lukasova, E. y Kozubek, S.** (2008). Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 2398-414.
- Fan, Q. Q. y Petes, T. D.** (1996). Relationship between nuclease-hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the HIS4 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**, 2037-43.
- Fernández-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. y Nussenzweig, A.** (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair (Amst)* **3**, 959-67.
- Fernández-Capetillo, O., Mahadevaiah, S. K., Celeste, A., Romanienko, P. J., Camerini-Otero, R. D., Bonner, W. M., Manova, K., Burgoyne, P. y Nussenzweig, A.** (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* **4**, 497-508.
- Fischle, W., Wang, Y. y Allis, C. D.** (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 172-83.
- Fletcher, H. L.** (1977). Localised chiasmata due to partial pairing: A 3D reconstruction of synaptonemal complexes in male *Stethophyma grossum*. *Chromosoma* **65**, 247-69.
- Franklin, A. E., McElver, J., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Bowen, B. y Cande, W. Z.** (1999). Three-dimensional microscopy of the Rad51 recombination protein during meiotic prophase. *Plant Cell* **11**, 809-24.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A. y Schubert, I.** (2006). Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends Plant Sci* **11**, 199-208.
- Fukuda, T. y Ohya, Y.** (2006). Recruitment of RecA homologs Dmc1p and Rad51p to the double-strand break repair site initiated by meiosis-specific endonuclease VDE (PI-SceI). *Mol Genet Genomics* **275**, 204-14.
- Gandhi, R., Gillespie, P. J. y Hirano, T.** (2006). Human Wapl is a cohesin-binding protein that promotes sister-chromatid resolution in mitotic prophase. *Curr Biol* **16**, 2406-17.
- Gartenberg, M.** (2009). Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *Chromosome Res* **17**, 229-38.
- Gerton, J. L. y DeRisi, J. L.** (2002). Mnd1p: an evolutionarily conserved protein required for meiotic recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6895-900.
- Gerton, J. L. y Hawley, R. S.** (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Genet* **6**, 477-87.
- Gómez, R., Valdeolmillos, A., Parra, M. T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J. S., Barbero, J. L. y Suja, J. A.** (2007). Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Rep* **8**, 173-80.
- González-García, J. M., Antonio, C., Suja, J. A. y Rufas, J. S.** (1996). Meiosis in holocentric chromosomes: kinetic activity is randomly restricted to the chromatid ends of sex univalents in *Graphosoma italicum* (Heteroptera). *Chromosome Res* **4**, 124-32.
- Granado, N., Rebollo, E., Sánchez, F. J. y Arana, P.** (2004). B chromosomes: the troubles of integration. *Cytogenet Genome Res* **106**, 402-10.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G. y Pelletier, G.** (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *Embo J* **20**, 589-600.
- Gruber, S., Haering, C. H. y Nasmyth, K.** (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**, 765-77.
- Guacci, V., Koshland, D. y Strunnikov, A.** (1997). A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of MCD1 in *S. cerevisiae*. *Cell* **91**, 47-57.
- Gullerova, M. y Proudfoot, N. J.** (2008). Cohesin complex promotes transcriptional termination between convergent genes in *S. pombe*. *Cell* **132**, 983-95.
- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwagen, A. y Nasmyth, K.** (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol Cell* **9**, 773-88.
- Haering, C. H., Schoffnegger, D., Nishino, T., Helmhart, W., Nasmyth, K. y Lowe, J.** (2004). Structure and stability of cohesin's Smc1-kleisin interaction. *Mol Cell* **15**, 951-64.

- Hakimi, M. A., Bochar, D. A., Schmiesing, J. A., Dong, Y., Barak, O. G., Speicher, D. W., Yokomori, K. y Shiekhata, R. (2002). A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature* **418**, 994-8.
- Hamant, O., Golubovskaya, I., Meeley, R., Fiume, E., Timofejeva, L., Schleiffer, A., Nasmyth, K. y Cande, W. Z. (2005). A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Curr Biol* **15**, 948-54.
- Hamer, G., Gell, K., Kouznetsova, A., Novak, I., Benavente, R. y Höög, C. (2006). Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* **119**, 4025-32.
- Hamer, G., Roepers-Gajadien, H. L., van Duyn-Goedhart, A., Gademan, I. S., Kal, H. B., van Buul, P. P. y de Rooij, D. G. (2003). DNA double-strand breaks and gamma-H2AX signaling in the testis. *Biol Reprod* **68**, 628-34.
- Hamer, G., Wang, H., Bolcun-Filas, E., Cooke, H. J., Benavente, R. y Höög, C. (2008). Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci* **121**, 2445-51.
- Hanneman, W. H., Legare, M. E., Sweeney, S. y Schimenti, J. C. (1997). Cisplatin increases meiotic crossing-over in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8681-5.
- Harper, L., Golubovskaya, I. y Cande, W. Z. (2004). A bouquet of chromosomes. *J Cell Sci* **117**, 4025-32.
- Hartung, F. y Puchta, H. (2000). Molecular characterisation of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **28**, 1548-54.
- Hayashi, K., Yoshida, K. y Matsui, Y. (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* **438**, 374-8.
- Henderson, S. A. (1971). Grades of chromatid organisation in mitotic and meiotic chromosomes. II. Their interpretation in terms of a master-slave model. *Chromosoma* **35**, 41-56.
- Henriques-Gil, N., Santos, J. L. y Arana, P. (1984). Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* **89**, 290-298.
- Hewitt, G. M. (1979). *Isecta 1. Orthoptera. Grasshoppers and Crickets*. Berlin.
- Heyting, C. (1996). Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 389-396.
- Heyting, C. (2005). Meiotic transverse filament proteins: essential for crossing over. *Transgenic Res* **14**, 547-50.
- Heyting, C., Dietrich, A. J., Redeker, E. J. y Vink, A. C. (1985). Structure and composition of synaptonemal complexes, isolated from rat spermatocytes. *Eur J Cell Biol* **36**, 307-14.
- Hirano, T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 311-22.
- Holmquist, G. P. y Ashley, T. (2006). Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res* **114**, 96-125.
- Howell, W. M. y Hsu, T. C. (1979). Chromosome core structure revealed by silver staining. *Chromosoma* **73**, 61-66.
- Hunter, N. y Kleckner, N. (2001). The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* **106**, 59-70.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G. y Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res* **104**, 14-20.
- Ivanovska, I. y Orr-Weaver, T. L. (2006). Histone modifications and the chromatin scaffold for meiotic chromosome architecture. *Cell Cycle* **5**, 2064-71.
- Iwai, T., Lee, J., Yoshii, A., Yokota, T., Mita, K. y Yamashita, M. (2004). Changes in the expression and localization of cohesin subunits during meiosis in a non-mammalian vertebrate, the medaka fish. *Gene Expr Patterns* **4**, 495-504.
- Jackson, N., Sánchez-Morán, E., Buckling, E., Armstrong, S. J., Jones, G. H. y Franklin, F. C. (2006). Reduced meiotic crossovers and delayed prophase I progression in AtMLH3-deficient *Arabidopsis*. *Embo J* **25**, 1315-23.
- Jin, H., Guacci, V. y Yu, H. G. (2009). Pds5 is required for homologue pairing and inhibits synapsis of sister chromatids during yeast meiosis. *J Cell Biol* **186**, 713-25.
- Jones, G. H. (1971). The analysis of exchanges in tritium-labelled meiotic chromosomes. *Chromosoma* **34**, 367-82.



- Jones, G. H. (1973). Light and electron microscope studies of chromosome pairing in relation to chiasma localisation in *Stethophyma grossum* (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma* **42**, 145-162.
- Jones, G. H. (1974). Modified synaptonemal complexes in spermatocytes of *Stethophyma grossum*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **38**, 109-15.
- Jones, G. H. y Franklin, F. C. (2006). Meiotic crossing-over: obligation and interference. *Cell* **126**, 246-8.
- Jones, G. H. y Wallace, B. M. N. (1980). Meiotic chromosome pairing in *Stethophyma grossum* spermatocyte studied by a surface-spreading and silver-staining technique. *Chromosoma* **78**, 189-201.
- Jones, R. N. (1995). B chromosomes in plants. *New Phytologist* **131**, 411-434.
- Jones, R. N. y Rees, H. (1982). B-chromosomes. London: Academic Press.
- Kateneva, A. V., Konovchenko, A. A., Guacci, V. y Dresser, M. E. (2005). Recombination protein Tid1p controls resolution of cohesin-dependent linkages in meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **171**, 241-53.
- Kauppi, L., Jeffreys, A. J. y Keeney, S. (2004). Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat Rev Genet* **5**, 413-24.
- Keeney, S., Giroux, C. N. y Kleckner, N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375-384.
- Kitajima, T. S., Kawashima, S. A. y Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* **427**, 510-7.
- Kitajima, T. S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S. A. y Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* **441**, 46-52.
- Kitajima, T. S., Yokobayashi, S., Yamamoto, M. y Watanabe, Y. (2003). Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science* **300**, 1152-5.
- Klasterska, I., Natarajan, A. T. y Ramel, C. (1976). An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas* **83**, 153-62.
- Kleckner, N. (1996). Meiosis: how could it work? *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8167-74.
- Kleckner, N. (2006). Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* **115**, 175-94.
- Kleckner, N., Storlazzi, A. y Zickler, D. (2003). Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends Genet* **19**, 623-8.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S. B., Michaelis, C., Nairz, K. y Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**, 91-103.
- Kouznetsova, A., Novak, I., Jessberger, R. y Höög, C. (2005). SYCP2 and SYCP3 are required for cohesin core integrity at diplotene but not for centromere cohesion at the first meiotic division. *J Cell Sci* **118**, 2271-8.
- Krasikova, A., Barbero, J. L. y Gaginskaya, E. (2005). Cohesion proteins are present in centromere protein bodies associated with avian lampbrush chromosomes. *Chromosome Res* **13**, 675-85.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B. H., Lipp, J. J., Schleiffer, A., Mechtler, K. y Peters, J. M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* **127**, 955-67.
- Kuo, L. J. y Yang, L. X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* **22**, 305-9.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G. B. y Boissonneault, G. (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* **78**, 324-32.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T. y Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *J Cell Sci* **116**, 2781-90.
- Lee, J., Yokota, T. y Yamashita, M. (2002). Analyses of mRNA expression patterns of cohesin subunits Rad21 and Rec8 in mice: germ cell-specific expression of rec8 mRNA in both male and female mice. *Zoolog Sci* **19**, 539-44.
- Lehmann, A. R. (2005). The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **4**, 309-14.
- Leu, J. Y., Chua, P. R. y Roeder, G. S. (1998). The meiosis-specific Hop2 protein of *S. cerevisiae* ensures synapsis between homologous chromosomes. *Cell* **94**, 375-86.
- Lichten, M. (2001). Meiotic recombination: breaking the genome to save it. *Curr Biol* **11**, R253-6.

- Liebe, B., Alsheimer, M., Höög, C., Benavente, R. y Scherthan, H.** (2004). Telomere attachment, meiotic chromosome condensation, pairing, and bouquet stage duration are modified in spermatocytes lacking axial elements. *Mol Biol Cell* **15**, 827-37.
- Lio, Y. C., Mazin, A. V., Kowalczykowski, S. C. y Chen, D. J.** (2003). Complex formation by the human Rad51B and Rad51C DNA repair proteins and their activities in vitro. *J Biol Chem* **278**, 2469-78.
- Liu, J. G., Yuan, L., Brundell, E., Bjorkroth, B., Daneholt, B. y Höög, C.** (1996). Localization of the N-terminus of SCP1 to the central element of the synaptonemal complex and evidence for direct interactions between the N-termini of SCP1 molecules organized head-to-head. *Exp Cell Res* **226**, 11-19.
- López-León, M. D., Neves, N., Schwarzacher, T., Heslop-Harrison, J. S., Hewitt, G. M. y Camacho, J. P.** (1994). Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res* **2**, 87-92.
- Lorenz, A., Wells, J. L., Pryce, D. W., Novatchkova, M., Eisenhaber, F., McFarlane, R. J. y Loidl, J.** (2004). *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *J Cell Sci* **117**, 3343-51.
- Loreto, V., Cabrero, J., López-León, M. D., Camacho, J. P. y de Souza, M. J.** (2008). Comparative analysis of rDNA location in five Neotropical gomphocerine grasshopper species. *Genetica* **132**, 95-101.
- Losada, A.** (2007). Cohesin regulation: fashionable ways to wear a ring. *Chromosoma* **116**, 321-9.
- Losada, A., Yokochi, T. y Hirano, T.** (2005). Functional contribution of Pds5 to cohesin-mediated cohesion in human cells and *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci* **118**, 2133-41.
- Losada, A., Yokochi, T., Kobayashi, R. y Hirano, T.** (2000). Identification and characterization of SA/Scp3p subunits in the *Xenopus* and human cohesin complexes. *J Cell Biol* **150**, 405-16.
- Lowndes, N. F. y Toh, G. W.** (2005). DNA repair: the importance of phosphorylating histone H2AX. *Curr Biol* **15**, R99-R102.
- Madigan, J. P., Chotkowski, H. L. y Glaser, R. L.** (2002). DNA double-strand break-induced phosphorylation of *Drosophila* histone variant H2Av helps prevent radiation-induced apoptosis. *Nucleic Acids Res* **30**, 3698-705.
- Mahadevaiah, S. K., Turner, J. M., Baudat, F., Rogakou, E. P., de Boer, P., Blanco-Rodríguez, J., Jasin, M., Keeney, S., Bonner, W. M. y Burgoyne, P. S.** (2001). Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* **27**, 271-276.
- Maine, E. M., Hauth, J., Ratliff, T., Vought, V. E., She, X. y Kelly, W. G.** (2005). EGO-1, a putative RNA-dependent RNA polymerase, is required for heterochromatin assembly on unpaired dna during *C. elegans* meiosis. *Curr Biol* **15**, 1972-8.
- Maison, C. y Almouzni, G.** (2004). HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 296-304.
- Manheim, E. A. y McKim, K. S.** (2003). The Synaptonemal complex component C(2)M regulates meiotic crossing over in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**, 276-85.
- Marcon, E. y Moens, P. B.** (2005). The evolution of meiosis: recruitment and modification of somatic DNA-repair proteins. *Bioessays* **27**, 795-808.
- Margueron, R., Trojer, P. y Reinberg, D.** (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**, 163-76.
- Masson, J. Y. y West, S. C.** (2001). The Rad51 and Dmc1 recombinases: a non-identical twin relationship. *Trends Biochem Sci* **26**, 131-6.
- McKim, K. S. y Hayashi-Hagihara, A.** (1998). mei-W68 in *Drosophila melanogaster* encodes a Spo11 homolog: evidence that the mechanism for initiating meiotic recombination is conserved. *Genes Dev* **12**, 2932-42.
- McPherson, J. P., Lemmers, B., Chahwan, R., Pamidi, A., Migon, E., Matysiak-Zablocki, E., Moynahan, M. E., Essers, J., Hanada, K., Poonepalli, A. y col.** (2004). Involvement of mammalian Mus81 in genome integrity and tumor suppression. *Science* **304**, 1822-6.
- Meuwissen, R. L. J., Offenberg, H. H., Dietrich, A. J. J., Riesewijk, A., van Iersel, M. y Heyting, C.** (1992). A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *Embo Journal* **11**, 5091-5100.
- Michaelis, C., Ciosk, R. y Nasmyth, K.** (1997). Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell* **91**, 35-45.
- Misulovin, Z., Schwartz, Y. B., Li, X. Y., Kahn, T. G., Gause, M., MacArthur, S., Fay, J. C., Eisen, M. B., Pirrotta, V., Biggin, M. D. y col.** (2008). Association of cohesin and Nipped-B with transcriptionally active regions of the *Drosophila melanogaster* genome. *Chromosoma* **117**, 89-102.

- Miyazaki, W. Y. y Orr-Weaver, T. L.** (1994). Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **28**, 167-187.
- Modesti, M. y Kanaar, R.** (2001). DNA repair: spot(light)s on chromatin. *Curr Biol* **11**, R229-32.
- Moens, P. B.** (1969). Multiple core complexes in grasshopper spermatocytes and spermatids. *J Cell Biol* **40**, 542-51.
- Moens, P. B.** (1994). Molecular perspectives of chromosome pairing at meiosis. *Bioessays* **16**, 101-6.
- Moens, P. B., Chen, D. J., Shen, Z., Kolas, N., Tarsounas, M., Heng, H. H. y Spyropoulos, B.** (1997). Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma* **106**, 207-15.
- Moens, P. B., Heyting, C., Dietrich, A. J., van Raamsdonk, W. y Chen, Q.** (1987). Synaptonemal complex antigen location and conservation. *J Cell Biol* **105**, 93-103.
- Moens, P. B., Kolas, N. K., Tarsounas, M., Marcon, E., Cohen, P. E. y Spyropoulos, B.** (2002). The time course and chromosomal localization of recombination-related proteins at meiosis in the mouse are compatible with models that can resolve the early DNA-DNA interactions without reciprocal recombination. *J Cell Sci* **115**, 1611-22.
- Moens, P. B. y Pearlman, R. E.** (1988). Chromatin organization at meiosis. *Bioessays* **9**, 151-3.
- Moens, P. B. y Spyropoulos, B.** (1995). Immunocytology of chiasmata and chromosomal disjunction at mouse meiosis. *Chromosoma* **104**, 175-82.
- Mognato, M., Girardi, C., Fabris, S. y Celotti, L.** (2009). DNA repair in modeled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with gamma-rays. *Mutat Res* **663**, 32-9.
- Moses, M. J.** (1956). Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. *J Biophys Biochem Cytol* **2**, 215-8.
- Nasmyth, K.** (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **35**, 673-745.
- Nasmyth, K.** (2005). How might cohesin hold sister chromatids together? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 483-96.
- Neale, M. J. y Keeney, S.** (2006). Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* **442**, 153-8.
- Neale, M. J., Pan, J. y Keeney, S.** (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* **436**, 1053-7.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S. I. y Watanabe, Y.** (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol* **4**, 89-93.
- Ocampo-Hafalla, M. T., Katou, Y., Shirahige, K. y Uhlmann, F.** (2007). Displacement and re-accumulation of centromeric cohesin during transient pre-anaphase centromere splitting. *Chromosoma* **116**, 531-44.
- Ohta, K., Shibata, T. y Nicolas, A.** (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *Embo J* **13**, 5754-63.
- Orellana, J. y Giráldez, R.** (1981). Metaphase I bound arms and crossing-over frequency in rye. Open pollinated varieties. *Chromosoma* **84**, 439-449.
- Page, J., Berrios, S., Rufas, J. S., Parra, M. T., Suja, J. A., Heyting, C. y Fernandez-Donoso, R.** (2003). The pairing of X and Y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by a dense plate developed from their axial elements. *J Cell Sci* **116**, 551-60.
- Page, J., de la Fuente, R., Gómez, R., Calvente, A., Viera, A., Parra, M. T., Santos, J. L., Berrios, S., Fernandez-Donoso, R., Suja, J. A. y col.** (2006). Sex chromosomes, synapsis, and cohesins: a complex affair. *Chromosoma* **115**, 250-259.
- Page, J., Suja, J. A., Santos, J. L. y Rufas, J. S.** (1998). Squash procedure for protein immunolocalization in meiotic cells. *Chromosome Res* **6**, 639-42.
- Page, S. L. y Hawley, R. S.** (2004). The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 525-58.
- Panizza, S., Tanaka, T., Hochwagen, A., Eisenhaber, F. y Nasmyth, K.** (2000). Pds5 cooperates with cohesin in maintaining sister chromatid cohesion. *Curr Biol* **10**, 1557-64.
- Parra, M. T., Viera, A., Gomez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J. L., Rufas, J. S. y Suja, J. A.** (2004a). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* **117**, 1221-34.

- Parra, M. T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J. L., Rufas, J. S. y Suja, J. A. (2004b). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *J Cell Sci* **117**, 1221-34.
- Parra, M. T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Carmena, M., Earnshaw, W. C., Rufas, J. S. y Suja, J. A. (2003). Dynamic relocalization of the chromosomal passenger complex proteins inner centromere protein (INCENP) and aurora-B kinase during male mouse meiosis. *J Cell Sci* **116**, 961-74.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D. y Loidl, J. (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev* **15**, 1349-60.
- Paulson, J. R. y Laemmli, U. K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* **12**, 817-28.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. y Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol* **10**, 886-95.
- Pelttari, J., Hoja, M. R., Yuan, L., Liu, J. G., Brundell, E., Moens, P., Santucci-Darmanin, S., Jessberger, R., Barbero, J. L., Heyting, C. y col. (2001). A meiotic chromosomal core consisting of cohesin complex proteins recruits DNA recombination proteins and promotes synapsis in the absence of an axial element in mammalian meiotic cells. *Mol Cell Biol* **21**, 5667-77.
- Perry, P. E. y Jones, G. H. (1974). Male and female meiosis in grasshoppers. I. *Stethophyma grossum*. *Chromosoma* **47**, 227-36.
- Peters, A. H., Plug, A. W., van Vugt, M. J. y de Boer, P. (1997). A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res* **5**, 66-68.
- Peters, J. M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-56.
- Peters, J. M., Tedeschi, A. y Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev* **22**, 3089-114.
- Peterson, D. G., Stack, S. M., Healy, J. L., Donohoe, B. S. y Anderson, L. K. (1994). The relationship between synaptonemal complex length and genome size in four vertebrate classes (Osteichthyes, Reptilia, Aves, Mammalia). *Chromosome Res* **2**, 153-62.
- Petes, T. D. (2001). Meiotic recombination hot spots and cold spots. *Nat Rev Genet* **2**, 360-9.
- Petronczki, M., Siomos, M. F. y Nasmyth, K. (2003). Un ménage à quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* **112**, 423-40.
- Petukhova, G., Sung, P. y Klein, H. (2000). Promotion of Rad51-dependent D-loop formation by yeast recombination factor Rdh54/Tid1. *Genes Dev* **14**, 2206-15.
- Petukhova, G. V., Romanienko, P. J. y Camerini-Otero, R. D. (2003). The Hop2 protein has a direct role in promoting interhomolog interactions during mouse meiosis. *Dev Cell* **5**, 927-36.
- Pezzi, N., Prieto, I., Kremer, L., Perez Jurado, L. A., Valero, C., Del Mazo, J., Martinez, A. C. y Barbero, J. L. (2000). STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *Faseb J* **14**, 581-92.
- Pigozzi, M. I. y Solari, A. J. (2003). Differential immunolocalization of a putative Rec8p in meiotic autosomes and sex chromosomes of triatomine bugs. *Chromosoma* **112**, 38-47.
- Pittman, D. L., Cobb, J., Schimenti, K. J., Wilson, L. A., Cooper, D. M., Brignull, E., Handel, M. A. y Schimenti, J. C. (1998). Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* **1**, 697-705.
- Plug, A. W., Peters, A. H., Keegan, K. S., Hoekstra, M. F., de Boer, P. y Ashley, T. (1998). Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. *J Cell Sci* **111** ( Pt 4), 413-23.
- Prieto, I., Pezzi, N., Buesa, J. M., Kremer, L., Barthelemy, I., Carreiro, C., Roncal, F., Martinez, A., Gomez, L., Fernandez, R. y col. (2002). STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis. *EMBO Rep* **3**, 543-50.
- Prieto, I., Suja, J. A., Pezzi, N., Kremer, L., Martinez, A. C., Rufas, J. S. y Barbero, J. L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* **3**, 761-6.
- Prieto, I., Tease, C., Pezzi, N., Buesa, J. M., Ortega, S., Kremer, L., Martinez, A., Martinez, A. C., Hulten, M. A. y Barbero, J. L. (2004). Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Res* **12**, 197-213.
- Quevedo, C., Del Cerro, A. L., Santos, J. L. y Jones, G. H. (1997). Correlated variation of chiasma frequency and synaptonemal complex length in *Locusta migratoria*. *Heredity* **78**, 515-519.

- Rabitsch, K. P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J. P., Eisenhaber, F. y Nasmyth, K. (2004). Two fission yeast homologs of *Drosophila* Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Curr Biol* **14**, 287-301.
- Rabitsch, K. P., Toth, A., Galova, M., Schleiffer, A., Schaffner, G., Aigner, E., Rupp, C., Penkner, A. M., Moreno-Borchart, A. C., Primig, M. y col. (2001). A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression. *Curr Biol* **11**, 1001-9.
- Ray-Chaudhuri, S. R. y Dutt, M. K. (1947). A comparative study of the chromosome structure and behaviour in three different genera of Indian grasshoppers. *Proc R Soc Edinb* **62**, 292-296.
- Rebollo, E. y Arana, P. (1995). A comparative study of orientation at behavior of univalent in living grasshopper spermatocytes. *Chromosoma* **104**, 56-67.
- Reddy, K. C. y Villeneuve, A. M. (2004). *C. elegans* HIM-17 links chromatin modification and competence for initiation of meiotic recombination. *Cell* **118**, 439-52.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Gross, B. y Jessberger, R. (2001). Novel meiosis-specific isoform of mammalian SMC1. *Mol Cell Biol* **21**, 6984-98.
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., Hodges, C. A., Hunt, P. A., Liebe, B., Scherthan, H. y Jessberger, R. (2004). Cohesin SMC1 beta is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nat Cell Biol* **6**, 555-562.
- Revenkova, E. y Jessberger, R. (2005). Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis. *Reproduction* **130**, 783-90.
- Revenkova, E. y Jessberger, R. (2006). Shaping meiotic prophase chromosomes: cohesins and synaptonemal complex proteins. *Chromosoma* **115**, 235-40.
- Riedel, C. G., Katis, V. L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Galova, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B. y col. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* **441**, 53-61.
- Rieder, C. L. y Cole, R. (1999). Chromatid cohesion during mitosis: lessons from meiosis. *J Cell Sci* **112** ( Pt 16), 2607-13.
- Rockmill, B., Sym, M., Scherthan, H. y Roeder, G. S. (1995). Roles for two RecA homologs in promoting meiotic chromosome synapsis. *Genes Dev* **9**, 2684-95.
- Roeder, G. S. (1997). Meiotic chromosomes: it takes two to tango. *Genes Dev* **11**, 2600-2621.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. y Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**, 905-16.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. y Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-68.
- Romanienko, P. J. y Camerini-Otero, R. D. (2000). The mouse Spo11 gene is required for meiotic chromosome synapsis. *Mol Cell* **6**, 975-87.
- Rothkamm, K. y Lobrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5057-62.
- Rowland, B. D., Roig, M. B., Nishino, T., Kurze, A., Uluocak, P., Mishra, A., Beckouet, F., Underwood, P., Metson, J., Imre, R. y col. (2009). Building sister chromatid cohesion: smc3 acetylation counteracts an antiestablishment activity. *Mol Cell* **33**, 763-74.
- Rufas, J. S., Giménez-Abián, J., Suja, J. A. y García de la Vega, C. (1987). Chromosome organization in meiosis revealed by light microscope analysis of silver-stained cores. *Genome* **29**, 706-712.
- Rufas, J. S., Giménez-Martín, G. y Esponda, P. (1982). Presence of a chromatid core in mitotic and meiotic chromosomes of grasshoppers. *Cell Biol Int Rep* **6**, 261-7.
- Rufas, J. S., Mazzella, C., García de la Vega, C. y Suja, J. A. (1994). Ultrastructural detection of kinetochores by silver impregnation. *Chromosome Res* **2**, 369-75.
- Rufas, J. S., Santos, J. L., Diez, M. y Suja, J. A. (1992). Meiotic chromosome structure: relationship between the synaptonemal complex and the chromatid cores. *Genome* **35**, 1054-1061.
- Saitoh, N., Goldberg, I. G., Wood, E. R. y Earnshaw, W. C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* **127**, 303-18.
- Saitoh, Y. y Laemmli, U. K. (1994). Metaphase chromosome structure: bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold. *Cell* **76**, 609-22.
- Sánchez-Morán, E., Santos, J. L., Jones, G. H. y Franklin, F. C. (2007). ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in Arabidopsis. *Genes Dev* **21**, 2220-33.
- Schär, P., Fasi, M. y Jessberger, R. (2004). SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **32**, 3921-9.

- Scherthan, H., Bahler, J. y Kohli, J.** (1994). Dynamics of chromosome organization and pairing during meiotic prophase in fission yeast. *J Cell Biol* **127**, 273-85.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Harle, M. y Cremer, T.** (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* **134**, 1109-25.
- Schmekel, K. y Daneholt, B.** (1995). The central region of the synaptonemal complex revealed in three dimensions. *Trends Cell Biol* **5**, 239-42.
- Schmekel, K., Meuwissen, R. L., Dietrich, A. J., Vink, A. C., van Marle, J., van Veen, H. y Heyting, C.** (1996). Organization of SCP1 protein molecules within synaptonemal complexes of the rat. *Exp Cell Res* **226**, 20-30.
- Schoenmakers, S., Wassenaar, E., van Cappellen, W. A., Derijck, A. A., de Boer, P., Laven, J. S., Grootegeod, J. A. y Baarends, W. M.** (2008). Increased frequency of asynapsis and associated meiotic silencing of heterologous chromatin in the presence of irradiation-induced extra DNA double strand breaks. *Dev Biol* **317**, 270-81.
- Schubert, V.** (2009). SMC proteins and their multiple functions in higher plants. *Cytogenet Genome Res* **124**, 202-14.
- Schwacha, A. y Kleckner, N.** (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* **90**, 1123-35.
- Sekelsky, J. J., Brodsky, M. H. y Burtis, K. C.** (2000). DNA repair in *Drosophila*: insights from the *Drosophila* genome sequence. *J Cell Biol* **150**, F31-6.
- Serrano, A., Rodriguez-Corsino, M. y Losada, A.** (2009). Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesin enrichment in human cells. *PLoS One* **4**, e5118.
- Shaw, D. D.** (1970). The supernumerary segment system of *Stethophyma*. I. Structural basis. *Chromosoma* **30**, 326-43.
- Shaw, D. D.** (1971). Genetic and environmental components of chiasma control. I. Spatial and temporal variation in *Schistocerca* and *Stethophyma*. *Chromosoma* **34**, 281-301.
- Shinohara, A., Gasior, S., Ogawa, T., Kleckner, N. y Bishop, D. K.** (1997). *Saccharomyces cerevisiae* recA homologues RAD51 and DMC1 have both distinct and overlapping roles in meiotic recombination. *Genes Cells* **2**, 615-29.
- Shinohara, A., Ogawa, H. y Ogawa, T.** (1992). Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* **69**, 457-70.
- Shinohara, A. y Shinohara, M.** (2004). Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet Genome Res* **107**, 201-7.
- Sims, S. J., Nishioka, K. y Reinberg, D.** (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet* **19**, 629-39.
- Sjögren, C. y Nasmyth, K.** (2001). Sister chromatid cohesion is required for postreplicative double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **11**, 991-5.
- Snowden, T., Acharya, S., Butz, C., Berardini, M. y Fishel, R.** (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell* **15**, 437-51.
- Solari, A. J. y Counce, S. J.** (1977). Synaptonemal complex karyotyping in *Melanoplus differentialis*. *J. Cell Sci* **26**, 229-250.
- Stack, S. M. y Anderson, L. K.** (2001). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res* **9**, 175-98.
- Storlazzi, A., Tesse, S., Gargano, S., James, F., Kleckner, N. y Zickler, D.** (2003). Meiotic double-strand breaks at the interface of chromosome movement, chromosome remodeling, and reductional division. *Genes Dev* **17**, 2675-87.
- Suja, J. A., Antonio, C., Debec, A. y Rufas, J. S.** (1999). Phosphorylated proteins are involved in sister-chromatid arm cohesion during meiosis I. *J Cell Sci* **112** (Pt 17), 2957-69.
- Suja, J. A., Antonio, C. y Rufas, J. S.** (1992). Involvement of chromatid cohesiveness at the centromere and chromosome arms in meiotic chromosome segregation: a cytological approach. *Chromosoma* **101**, 493-501.
- Suja, J. A. y Barbero, J. L.** (2009). Cohesin complexes and sister chromatid cohesion in mammalian meiosis. *Genome Dyn* **5**, 94-116.
- Suja, J. A., de la Torre, J., Giménez-Abián, J. F., García de la Vega, C. y Rufas, J. S.** (1991). Meiotic chromosome structure. Kinetochores and chromatid cores in standard and B chromosomes of *Arcyptera fusca* (Orthoptera) revealed by silver staining. *Genome* **34**, 19-27.

- Suja, J. A. y Rufas, J. S.** (1994). The telochore: a telomeric differentiation of the chromosome axis. *Chromosome Res* **2**, 361-8.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H. y Peters, J. M.** (2000). Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol* **151**, 749-62.
- Sutani, T., Kawaguchi, T., Kanno, R., Itoh, T. y Shirahige, K.** (2009). Budding yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. *Curr Biol* **19**, 492-7.
- Tanaka, K., Hao, Z., Kai, M. y Okayama, H.** (2001). Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *Embo J* **20**, 5779-90.
- Tarsounas, M., Morita, T., Pearlman, R. E. y Moens, P. B.** (1999). RAD51 and DMC1 form mixed complexes associated with mouse meiotic chromosome cores and synaptonemal complexes. *J Cell Biol* **147**, 207-220.
- Terasawa, M., Ogawa, H., Tsukamoto, Y., Shinohara, M., Shirahige, K., Kleckner, N. y Ogawa, T.** (2007). Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5965-70.
- Terasawa, M., Shinohara, A., Hotta, Y., Ogawa, H. y Ogawa, T.** (1995). Localization of RecA-like recombination proteins on chromosomes of the lily at various meiotic stages. *Genes Dev* **9**, 925-34.
- Tomonaga, T., Nagao, K., Kawasaki, Y., Furuya, K., Murakami, A., Morishita, J., Yuasa, T., Sutani, T., Kearsey, S. E., Uhlmann, F. y col.** (2000). Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev* **14**, 2757-70.
- Tsubouchi, H. y Roeder, G. S.** (2003). The importance of genetic recombination for fidelity of chromosome pairing in meiosis. *Dev Cell* **5**, 915-25.
- Uhlmann, F.** (2001). Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 754-61.
- Uhlmann, F., Lottspeich, F. y Nasmyth, K.** (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**, 37-42.
- Uhlmann, F. y Nasmyth, K.** (1998). Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr Biol* **8**, 1095-101.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupart, M. A., Koonin, E. V. y Nasmyth, K.** (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**, 375-86.
- Valdeolillos, A., Rufas, J. S., Suja, J. A., Vass, S., Heck, M. M., Martínez, A. C. y Barbero, J. L.** (2004). Drosophila cohesins DSA1 and Drad21 persist and colocalize along the centromeric heterochromatin during mitosis. *Biol Cell* **96**, 457-62.
- Valdeolillos, A. M., Viera, A., Page, J., Prieto, I., Santos, J. L., Parra, M. T., Heck, M. M., Martínez, A. C., Barbero, J. L., Suja, J. A. y col.** (2007). Sequential loading of cohesin subunits during the first meiotic prophase of grasshoppers. *PLoS Genet* **3**, e28.
- van Heemst, D., James, F., Poggeler, S., Berteaux-Lecellier, V. y Zickler, D.** (1999). Spo76p is a conserved chromosome morphogenesis protein that links the mitotic and meiotic programs. *Cell* **98**, 261-71.
- Vass, S., Cotterill, S., Valdeolillos, A. M., Barbero, J. L., Lin, E., Warren, W. D. y Heck, M. M.** (2003). Depletion of Drad21/Scc1 in Drosophila cells leads to instability of the cohesin complex and disruption of mitotic progression. *Curr Biol* **13**, 208-18.
- Verni, F., Gandhi, R., Goldberg, M. L. y Gatti, M.** (2000). Genetic and molecular analysis of wings apart-like (wapl), a gene controlling heterochromatin organization in Drosophila melanogaster. *Genetics* **154**, 1693-710.
- Viera, A., Calvente, A., Page, J., Parra, M. T., Gomez, R., Suja, J. A., Rufas, J. S. y Santos, J. L.** (2004). X and B chromosomes display similar meiotic characteristics in male grasshoppers. *Cytogenet Genome Res* **106**, 302-8.
- Viera, A., Page, J. y Rufas, J. S.** (2009a). Inverted Meiosis: The True Bugs as a Model to Study: Karger.
- Viera, A., Santos, J. L. y Rufas, J. S.** (2009b). Relationship between incomplete synapsis and chiasma localization. *Chromosoma* **118**, 377-89.
- Waizenegger, I. C., Hauf, S., Meinke, A. y Peters, J. M.** (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* **103**, 399-410.
- Wallace, B. M. N. y Jones, G. H.** (1978). Incomplete chromosome pairing and its relation to chiasma localisation in *Stethophyma grossum* spermatocytes. *Heredity* **40**, 385-396.

- Wang, T. F., Kleckner, N. y Hunter, N.** (1999). Functional specificity of MutL homologs in yeast: evidence for three Mlh1-based heterocomplexes with distinct roles during meiosis in recombination and mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13914-9.
- Ward, I. M. y Chen, J.** (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem* **276**, 47759-62.
- Warren, W. D., Steffensen, S., Lin, E., Coelho, P., Loupart, M., Cobbe, N., Lee, J. Y., McKay, M. J., Orr-Weaver, T., Heck, M. M. y col.** (2000). The Drosophila RAD21 cohesin persists at the centromere region in mitosis. *Curr Biol* **10**, 1463-6.
- Watanabe, Y.** (2004). Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *J Cell Sci* **117**, 4017-23.
- Watanabe, Y.** (2005). Sister chromatid cohesion along arms and at centromeres. *Trends Genet* **21**, 405-12.
- Watanabe, Y. y Nurse, P.** (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* **400**, 461-4.
- Watrin, E. y Peters, J. M.** (2006). Cohesin and DNA damage repair. *Exp Cell Res* **312**, 2687-93.
- Wells, J. L., Pryce, D. W. y McFarlane, R. J.** (2006). Homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **23**, 977-89.
- White, M. J.** (1965). Chiasmatic and Achiasmatic Meiosis in African Eumastacid Grasshoppers. *Chromosoma* **16**, 271-307.
- Wood, J. L. y Chen, J.** (2008). DNA-damage checkpoints: location, location, location. *Trends Cell Biol* **18**, 451-5.
- Wu, T. C. y Lichten, M.** (1994). Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* **263**, 515-8.
- Xu, H., Beasley, M., Verschoor, S., Inselman, A., Handel, M. A. y McKay, M. J.** (2004). A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse. *EMBO Rep* **5**, 378-84.
- Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M. y Watanabe, Y.** (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* **455**, 251-5.
- Yamashita, K., Shinohara, M. y Shinohara, A.** (2004). Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11380-5.
- Young, J. A., Schreckhise, R. W., Steiner, W. W. y Smith, G. R.** (2002). Meiotic recombination remote from prominent DNA break sites in *S. pombe*. *Mol Cell* **9**, 253-63.
- Zhang, N., Kuznetsov, S. G., Sharan, S. K., Li, K., Rao, P. H. y Pati, D.** (2008). A handcuff model for the cohesin complex. *J Cell Biol* **183**, 1019-31.
- Zhang, Z., Ren, Q., Yang, H., Conrad, M. N., Guacci, V., Kateneva, A. y Dresser, M. E.** (2005). Budding yeast PDS5 plays an important role in meiosis and is required for sister chromatid cohesion. *Mol Microbiol* **56**, 670-80.
- Zickler, D. y Kleckner, N.** (1998). The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* **32**, 619-97.
- Zickler, D. y Kleckner, N.** (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* **33**, 603-754.
- Zinner, R., Albiez, H., Walter, J., Peters, A. H., Cremer, T. y Cremer, M.** (2006). Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochem Cell Biol* **125**, 3-19.
- Zou, H., McGarry, T. J., Bernal, T. y Kirschner, M. W.** (1999). Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science* **285**, 418-22.



